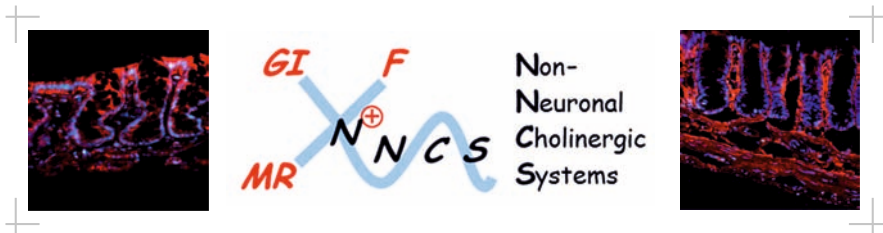


# Das non-neuronale cholinerge System des Kolons der Ratte

---

**SANDRA BADER**

---



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie und –Biochemie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. M. Diener

# **Das non-neuronale cholinerge System des Kolons der Ratte**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Sandra Bader**

Tierärztin aus Ulm

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Martin Diener

Prof. Dr. Reto Neiger

Tag der Disputation: 12.11.2014



*Man merkt nie, was schon getan wurde,  
man sieht immer nur, was noch zu tun bleibt.*

Marie Curie



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Cholinerge Systeme .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Acetylcholin: mehr als ein Neurotransmitter .....	1
1.1.2	Non-neuronales cholinerges System .....	1
<b>1.2</b>	<b>Acetylcholin: Synthese, Freisetzung, Abbau und Recycling in neuronalen und non-neuronalen Zellen .....</b>	<b>3</b>
1.2.1	Synthese von Acetylcholin .....	3
1.2.2	Speicherung und Freisetzung von Acetylcholin .....	4
1.2.3	Abbau von Acetylcholin .....	5
1.2.4	Aufnahme von Cholin .....	6
<b>1.3</b>	<b>Acetylcholinrezeptoren .....</b>	<b>9</b>
1.3.1	Nikotinerge Acetylcholinrezeptoren .....	9
1.3.1.1	Aufbau und Einteilung .....	9
1.3.1.2	Signaltransduktion .....	12
1.3.2	Muskarinerge Acetylcholinrezeptoren .....	13
1.3.2.1	Aufbau und Einteilung .....	13
1.3.2.2	Signaltransduktion .....	14
<b>1.4</b>	<b>Das Kolon .....</b>	<b>16</b>
1.4.1	Anatomie und Histologie der Darmwand .....	16
1.4.2	Das Kolonepithel .....	18
1.4.3	Funktionen des Kolonepithels .....	19
1.4.4	Sekretionsmechanismen am Kolon .....	20
1.4.5	Cholinerge Regulation des Ionentransportes im Kolon .....	21
1.4.6	Kurzkettige Fettsäuren .....	22
<b>1.5</b>	<b>Eigene Fragestellung .....</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1</b>	<b>Versuchstiere .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2</b>	<b>Lösungen .....</b>	<b>25</b>
2.2.1	Lösungen für die Kryptenisolation .....	25
2.2.1.1	Isolutionslösung .....	25
2.2.1.2	Auffangtyrode .....	25
2.2.2	Lösungen für die Ussingkammer-Versuche .....	26
2.2.2.1	Bicarbonat-gepufferte Parsonslösung (Standard) .....	26
2.2.2.2	Chloridfreie Parsonslösung .....	26
2.2.2.3	Calciumfreie Parsonslösung .....	26
2.2.3	Lösungen für die immunhistochemischen Versuche .....	27
2.2.3.1	Gelatinelösung zur Beschichtung der Objektträger .....	27
2.2.3.2	Gelatinelösung zur Gewebeeinbettung .....	27
2.2.3.3	Phosphatpuffer (PB) .....	27
2.2.3.4	Paraformaldehyd-Lösung (PFA 4%) .....	27
2.2.3.5	Blocking-Lösung .....	27
2.2.3.6	Primärantikörperlösungen .....	28

2.2.3.7	Sekundärantikörperlösungen .....	28
2.2.3.8	DAPI-Lösung .....	28
2.2.4	Lösungen für die $\text{Ca}^{2+}$ -Imagingversuche .....	29
2.2.4.1	Fura-2 AM-Lösung.....	29
2.2.4.2	Standard-Tyrodelösung .....	29
2.2.4.3	$\text{Ca}^{2+}$ -freie Tyrodelösung .....	29
2.2.5	Lösungen für die Enzymhistochemie .....	30
2.2.5.1	Maleatpuffer .....	30
2.2.5.2	Citratpuffer .....	30
2.2.5.3	Inkubationslösung .....	30
<b>2.3</b>	<b>Substanzen.....</b>	<b>31</b>
<b>2.4</b>	<b>Gewebepräparation.....</b>	<b>32</b>
2.4.1	Herstellung der Mukosa-Submukosa-Präparate.....	32
2.4.2	Herstellung der Mukosa-Präparate.....	33
2.4.3	Die Präparation isolierter Krypten .....	35
<b>2.5</b>	<b>Zellkultur der HT29/B6 Zellen .....</b>	<b>36</b>
2.5.1	Kulturbedingungen.....	36
2.5.2	Auftauen der Zellen.....	36
2.5.3	Passagieren der Zellen.....	37
<b>2.6</b>	<b>Immunfluoreszenz-Analyse .....</b>	<b>38</b>
2.6.1	Grundlagen der Immunfluoreszenz .....	38
2.6.2	Immunfluoreszenzmarkierung an Gewebeschnitten .....	39
2.6.2.1	Gelatinebeschichtung der Objektträger .....	39
2.6.2.2	Fixierung und Gelatine-Einbettung des Gewebes .....	39
2.6.2.3	Herstellung der Gewebeschnitte.....	40
2.6.2.4	Verwendete Antikörper .....	41
2.6.2.5	Färbeprotokoll .....	42
2.6.2.6	Negativkontrollen .....	44
2.6.2.7	Mikroskopie.....	44
<b>2.7</b>	<b>Enzymhistochemischer Nachweis der Esteraseaktivität .....</b>	<b>45</b>
<b>2.8</b>	<b>Polymerasekettenreaktion (PCR) .....</b>	<b>47</b>
2.8.1	Prinzip der PCR.....	47
2.8.2	RNA-Isolation aus Krypten des distalen Kolons .....	49
2.8.3	RNA-Isolation aus der Kolonmukosa .....	49
2.8.4	RNA-Isolation aus Referenzgewebe .....	50
2.8.5	Reverse Transkription .....	51
2.8.6	Verwendete Primer.....	53
2.8.7	Durchführung der PCR.....	55
2.8.8	Kontrollreaktionen.....	57
2.8.9	Gelelektrophorese.....	57
<b>2.9</b>	<b>Ussingkammer-Messungen.....</b>	<b>58</b>
2.9.1	Die Messkammer.....	58
2.9.2	Theorie der Ussingkammer-Technik.....	60
2.9.3	Versuchsdurchführung und Datenerfassung .....	63
<b>2.10</b>	<b><math>\text{Ca}^{2+}</math>-Imaging.....</b>	<b>64</b>
2.10.1	Theorie des $\text{Ca}^{2+}$ -Imagings.....	64
2.10.2	Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 .....	66

2.10.3	Der Imaging-Messstand .....	67
2.10.4	Die Imaging-Messkammer mit Perfusionssystem.....	68
2.10.5	Versuchsdurchführung der $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen .....	68
<b>2.11</b>	<b>Messung der Acetylcholinfreisetzung mittels HPLC .....</b>	<b>71</b>
<b>2.12</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>71</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>72</b>
<b>3.1</b>	<b>Das epitheliale cholinerge System des distalen Kolons der Ratte.....</b>	<b>72</b>
3.1.1	Aufnahme von Cholin in die Kolonepithelzelle.....	72
3.1.1.1	Immunhistochemischer Nachweis des CHT1 .....	72
3.1.1.2	Molekularbiologischer Nachweis des CHT1 .....	73
3.1.1.3	Untersuchung der Bedeutung des CHT1 für die epitheliale Acetylcholinsynthese mithilfe von Ussingkammer-Versuchen .....	75
3.1.1.4	Untersuchung der Bedeutung des CHT1 für die epitheliale Acetylcholinsynthese mithilfe von HPLC-Messungen .....	79
3.1.2	Acetylcholinsynthese in der Kolonepithelzelle.....	81
3.1.2.1	Immunhistochemischer Nachweis der ChAT und der CarAT .....	81
3.1.2.2	Molekularbiologischer Nachweis der ChAT und der CarAT .....	82
3.1.2.3	Untersuchung der Bedeutung der ChAT und der CarAT für die epitheliale Acetylcholinsynthese mittels Ussingkammer-Versuche .....	84
3.1.3	Speicherung von Acetylcholin in Kolonepithelzellen.....	87
3.1.3.1	Immunhistochemischer Nachweis des VACHT .....	87
3.1.3.2	Molekularbiologischer Nachweis des VACHT .....	89
3.1.3.3	Untersuchung der Bedeutung des VACHT für die Speicherung von epitheliale Acetylcholin mithilfe von Ussingkammer-Versuchen .....	90
3.1.4	Acetylcholinfreisetzung aus dem Kolonepithel .....	92
3.1.4.1	Immunhistochemischer Nachweis der OCTs.....	92
3.1.4.2	Molekularbiologischer Nachweis der OCTs .....	94
3.1.4.3	Untersuchung der Bedeutung der OCTs für die Freisetzung des epithelialen Acetylcholins mithilfe von Ussingkammer-Versuchen.....	95
3.1.4.4	Untersuchung der Bedeutung der OCTs für die Freisetzung des epithelialen Acetylcholins mithilfe von HPLC-Messungen.....	98
3.1.5	Nachweis der Esteraseaktivität im Kolonepithel .....	100
<b>3.2</b>	<b>Signalübertragung des epithelialen Acetylcholins .....</b>	<b>101</b>
3.2.1	Propionat bewirkt einen Anstieg der zytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in isolierten Krypten .....	101
3.2.1.1	$\text{Ca}^{2+}$ - Imaging Versuche mit HT29/B6-Zellen .....	107
<b>3.3</b>	<b>Nikotinerge Acetylcholinrezeptoren am Kolonepithel der Ratte ...</b>	<b>109</b>
3.3.1	Molekularbiologischer Nachweis von Untereinheiten der nikotinerger Acetylcholinrezeptoren .....	109
3.3.2	Die Wirkung von Nikotin am Kolonepithel der Ratte .....	111
3.3.2.1	Der Nikotinrezeptor-Agonist DMPP induziert einen TTX-resistenten Anstieg des $I_{\text{sc}}$ an der Kolonmukosa .....	111
3.3.2.2	Nikotin induziert einen konzentrationsabhängigen Anstieg des $I_{\text{sc}}$ an der Kolonmukosa .....	112
3.3.2.3	Der Nikotin-induzierte $I_{\text{sc}}$ -Anstieg wird von einer $\text{Cl}^-$ -Sekretion getragen und ist $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig .....	114

<b>3.4</b>	<b>Atypische Agonisten .....</b>	<b>116</b>
3.4.1	Cholin .....	116
3.4.1.1	Cholin induziert einen konzentrationsabhängigen Anstieg des $I_{sc}$ im distalen Kolon.....	116
3.4.1.2	Cholin induziert eine Tetrodotoxin-resistente, Atropin-sensitive $Cl^-$ -Sekretion.....	117
3.4.2	Butyrylcholin und Propionylcholin .....	122
3.4.2.1	Butyrylcholin und Propionylcholin induzieren einen konzentrationsabhängigen $I_{sc}$ -Anstieg.....	122
3.4.2.2	Der durch Butyrylcholin und Propionylcholin induzierte Anstieg des $I_{sc}$ entsteht durch Stimulation von Muskarinrezeptoren.....	123
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>125</b>
<b>4.1</b>	<b>Non-neuronales Acetylcholin: von der Synthese zur Freisetzung ..</b>	<b>125</b>
4.1.1	Synthese von Acetylcholin .....	125
4.1.2	Speicherung und Freisetzung von Acetylcholin.....	127
4.1.3	Abbau von Acetylcholin.....	131
4.1.4	Aufnahme von Cholin .....	132
4.1.5	Signaltransduktion von epitheliale Acedylcholin .....	135
<b>4.2</b>	<b>Epitheliale nikotinerge Rezeptoren .....</b>	<b>138</b>
4.2.1	Nikotinrezeptor-Untereinheiten im Kolonepithel .....	138
4.2.2	Funktionelle Charakterisierung der nAChR im Kolonepithel.....	139
<b>4.3</b>	<b>Ungewöhnliche Agonisten an cholinergen Rezeptoren.....</b>	<b>141</b>
4.3.1	Cholin .....	141
4.3.2	Butyrylcholin und Propionylcholin .....	143
<b>4.4</b>	<b>Fazit .....</b>	<b>144</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>146</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>148</b>
<b>7</b>	<b>VERZEICHNISSE .....</b>	<b>150</b>
<b>7.1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>150</b>
<b>7.2</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>153</b>
<b>7.3</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>155</b>
<b>7.4</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>156</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>169</b>
<b>9</b>	<b>EIGENE PUBLIKATIONEN .....</b>	<b>171</b>
	<b>ERKLÄRUNG.....</b>	<b>172</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Cholinerge Systeme

### 1.1.1 Acetylcholin: mehr als ein Neurotransmitter

Acetylcholin, das zentrale Molekül des sogenannten cholinergen Systems, ist bekannt als der erste klassische Neurotransmitter, der 1921 von Otto Loewi entdeckt wurde. Loewi konnte zeigen, dass die Nervenendigungen des N. vagus eine Substanz, den *Vagusstoff*, freisetzen (Loewi 1921). Wenige Jahre später wurde dieser *Vagusstoff* von Henry Dale als Acetylcholin identifiziert (Tansey 2006). Obwohl man Acetylcholin zu dieser Zeit auch schon in Mutterkorn nachgewiesen hatte (Ewins 1914), konzentrierte sich die Forschung vor allem auf dessen Wirkung als Neurotransmitter. Mit den Jahren mehrten sich jedoch die Hinweise, dass Acetylcholin nicht nur ein Neurotransmitter ist. So konnte Acetylcholin in einzelligen (Bayer und Wense 1936), in Pflanzen (Hartmann und Kilbinger 1974) und in der menschlichen Plazenta, einem nicht cholinerg innervierten Organ (Comline 1946), nachgewiesen werden. Seitdem gelang es in zahlreichen weiteren Untersuchungen, die Expression von Bestandteilen des cholinergen Systems oder Acetylcholin selbst in nicht-neuronalen Zellen nachzuweisen (Übersicht siehe: Sastry und Sadavongvivad 1978, Wessler et al. 1998).

### 1.1.2 Non-neuronales cholinerges System

Die Synthese, Speicherung und Freisetzung von Acetylcholin in cholinergen Neuronen und die darauffolgende Aktivierung von nikotinergen bzw. muskarinergen Acetylcholinrezeptoren an der Effektorzelle wird als *neuronales cholinerges System* bezeichnet. Das cholinerge System in nicht-neuronalen Geweben wird entsprechend als *non-neuronales cholinerges System* bezeichnet (Grando et al. 2003).

Das non-neuronale cholinerge System ist zwar noch nicht so lange bekannt und so gut erforscht wie das neuronale cholinerge System, dennoch ist es evolutionsgeschichtlich das Ältere von beiden. Heute weiß man, dass Acetylcholin ein phylogenetisch sehr alter Botenstoff ist, der in biologischen Systemen ubiquitär verbreitet ist. So kommt Acetylcholin nicht nur in Säugetierzellen vor, sondern auch in Bakterien, Pilzen, Schwämmen, Algen und wirbellosen Tieren (Wessler et al. 1999, Horiuchi et al. 2003, Kawashima et al. 2007). Acetylcholin fungiert offenkundig seit über 3 Milliarden

Jahren als Botenstoff in non-neuronalen Zellen. Im Vergleich dazu ist die Zeitspanne von einer halben Milliarde Jahre, in der Acetylcholin als Neurotransmitter wirkt, sehr kurz (Grando et al. 2003).

Mittlerweile ist das Vorhandensein von Acetylcholin oder von Proteinen bzw. Enzymen für seine Synthese, Speicherung und Freisetzung an zahlreichen nicht-neuronalen Geweben dokumentiert. So ist das non-neuronale cholinerge System im Atemwegsepithel sehr gut untersucht und detailliert beschrieben (für eine Zusammenfassung siehe Kummer und Krasteva-Christ 2014). Desweiteren wurden Komponenten des non-neuronalen cholinergen Systems u. a. an der Haut (Kurzen et al. 2007) und im Urothel (Lips et al. 2007b) gefunden. In den Epithelzellen des Kolons von Mensch und Ratte wurden Acetylcholin und die Cholinacetyltransferase (ChAT), das Schlüsselenzym der Acetylcholinsynthese, nachgewiesen (Klapproth et al. 1997).

In nicht-neuronalen Zellen wirkt Acetylcholin lokal als Botenstoff auf zellulärer Ebene oder auf autokrine oder parakrine Weise als Zytotransmitter und kann verschiedene Zellfunktionen regulieren, wie z. B. Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Sekretion, Organisation des Zytoskeletts, Zell-Zell-Kontakte, Zilienaktivität und Immunfunktionen (Grando et al. 2003).



## **1.2 Acetylcholin: Synthese, Freisetzung, Abbau und Recycling in neuronalen und non-neuronalen Zellen**

### **1.2.1 Synthese von Acetylcholin**

Die Synthese von Acetylcholin aus Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) und Cholin läuft im Zytoplasma ab und wird durch das Enzym Cholinacetyltransferase (ChAT) katalysiert (Abb. 1.1 und 1.2; Nachmansohn und Machado 1943). Acetyl-CoA entsteht bei der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren in den Mitochondrien und wird aus diesen in das Zytoplasma abgegeben. Cholin stammt entweder aus dem intrazellulären Abbau von cholinhaltigen Phospholipiden oder wird über Transportsysteme aus dem Extrazellulärraum aufgenommen (siehe Kapitel 1.2.4). Die ChAT zeigt zwar eine hohe Spezifität für Cholin, akzeptiert aber unterschiedliche Acylgruppen. So konnte am Gehirn der Ratte gezeigt werden, dass die ChAT für Propionyl-CoA und Butyryl-CoA dieselbe Affinität aufweist wie für Acetyl-CoA (Rossier 1977). Deshalb geht man davon aus, dass die ChAT nicht nur die Acetylcholinsynthese katalysiert, sondern auch an der Synthese von Butyrylcholin und Propionylcholin beteiligt ist (Rossier 1977, Wessler et al. 1998).

In nicht-neuronalen Zellen wie Herz- und Skelettmuskelzellen kann Acetylcholin auch durch die Carnitinacetyltransferase (CarAT) synthetisiert werden (Tucek 1982, White und Wu 1973). Bei der CarAT handelt es sich um ein ubiquitär exprimiertes Enzym des Fettstoffwechsels, das in der Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Die ChAT konnte ebenfalls nicht nur in Neuronen, sondern auch in zahlreichen non-neuronalen Zellen nachgewiesen werden. Als Beispiele seien Epithelzellen des humanen Dün- und Dickdarms (Klapproth et al. 1997), Endothelzellen und Immunzellen genannt (Übersicht siehe Wessler und Kirkpatrick 2008).

### 1.2.2 Speicherung und Freisetzung von Acetylcholin

In neuronalen Zellen wird Acetylcholin nach der Synthese über den vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT) in Vesikel verpackt (Arvidsson et al. 1997), dort gespeichert und nach Eintreffen eines Aktionspotentials über Exozytose freigesetzt. Der VACHT wurde zwar auch in non-neuronalen Geweben nachgewiesen, wie z. B. in der Plazenta (Pfeil et al. 2004) und im Bronchialepithel (Proskocil 2004). Da der VACHT jedoch in non-neuronalen Zellen nicht ubiquitär exprimiert wird, ist aber davon auszugehen, dass Acetylcholin in diesen Zellen nicht in Vesikeln gespeichert wird, sondern direkt aus dem Zytoplasma freigesetzt wird. Weil Acetylcholin ein organisches Kation ist, kann die Freisetzung durch organische Kationentransporter (OCTs) vermittelt werden. Die polyspezifischen OCTs transportieren hydrophile Substanzen bidirektional, elektrogen und natriumunabhängig. Organische Kationentransporter zeigen eine weite Verbreitung in Epithelien und Neuronen im Körper, mit unterschiedlichen Expressionsmustern der drei Isoformen OCT1, 2 und 3. Sie konnten u. a. in folgenden Geweben nachgewiesen werden: im Bronchialepithel der Ratte (OCT1-3) (Lips et al. 2005b), in der Plazenta des Menschen (OCT1/3, Koepsell et al. 2007) oder in der Niere der Ratte und des Menschen (OCT1-3; Koepsell et al. 2007).

Für die humane Plazenta konnte gezeigt werden, dass OCT1 und OCT3 die Freisetzung von Acetylcholin vermitteln (Wessler et al. 2001). An *Xenopus*-Oozyten, die mit den drei OCT Isoformen transfiziert wurden, konnte mithilfe elektrophysiologischer Messungen eine OCT1- und OCT2-vermittelte Acetylcholinfreisetzung nachgewiesen werden (Lips et al. 2005b). Kummer et al. (Kummer et al. 2006) beschreiben einen im Vergleich zum Wildtyp zweifach erhöhten Acetylcholingehalt im Bronchialepithel von OCT1/2-Doppelknockout-Mäusen, was auf eine wichtige Rolle der OCTs für die Acetylcholinfreisetzung aus diesem Epithel schließen lässt.

### 1.2.3 Abbau von Acetylcholin

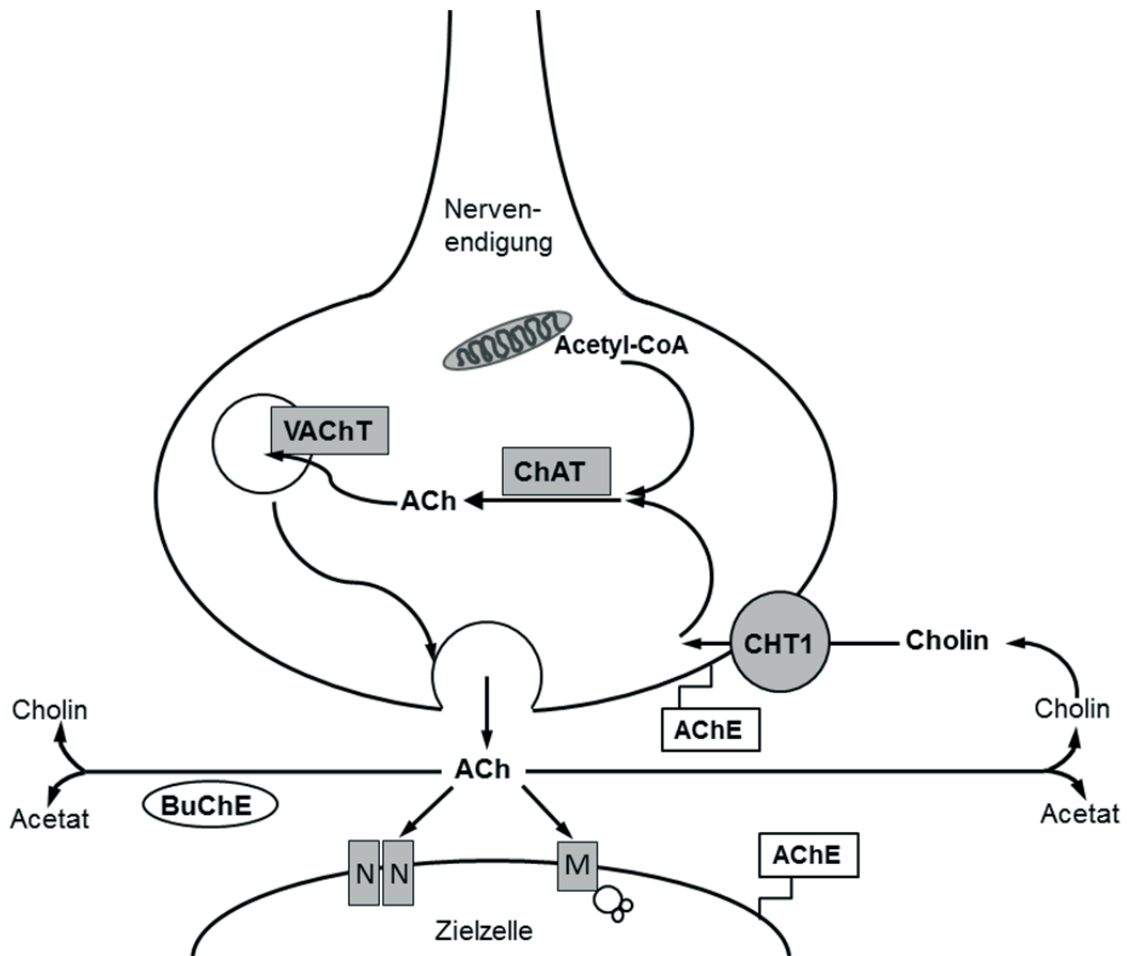
Das freigesetzte Acetylcholin kann mit nikotinergen oder muskarinergen Acetylcholinrezeptoren auf den Zielzellen interagieren und dadurch seine potentielle Wirkung vermitteln (siehe Kap 1.3). Um Acetylcholin zu inaktivieren, wird es durch die Acetylcholinesterase (AChE) und die Butyrylcholinesterase (BuChE) in seine Bestandteile Acetat und Cholin gespalten (Abb. 1.1 und 1.2). Die spezifische Acetylcholinesterase zeigt bereits bei niedrigen Acetylcholin-Konzentrationen eine hohe Aktivität, während die unspezifische Butyrylcholinesterase (auch Pseudocholinesterase genannt) Acetylcholin nur bei hohem Substratangebot hydrolysiert. Die beiden Cholinesterasen sind nahezu ubiquitär in Säugetierzellen verbreitet, d. h. sie kommen sowohl in neuronalen als auch in non-neuronalen Zellen vor (Übersicht siehe: Wessler et al. 1998). Die schnelle Inaktivierung von Acetylcholin verhindert dessen hormonartige Ausbreitung über den Blutstrom, sodass die Wirkung von Acetylcholin auf die Region seiner Freisetzung beschränkt ist.

Das durch die Hydrolyse von Acetylcholin freigesetzte Cholin kann mithilfe von Cholintransportern in die Zelle aufgenommen werden und steht somit erneut für die Synthese von Acetylcholin zur Verfügung (Abb. 1.1).

### 1.2.4 Aufnahme von Cholin

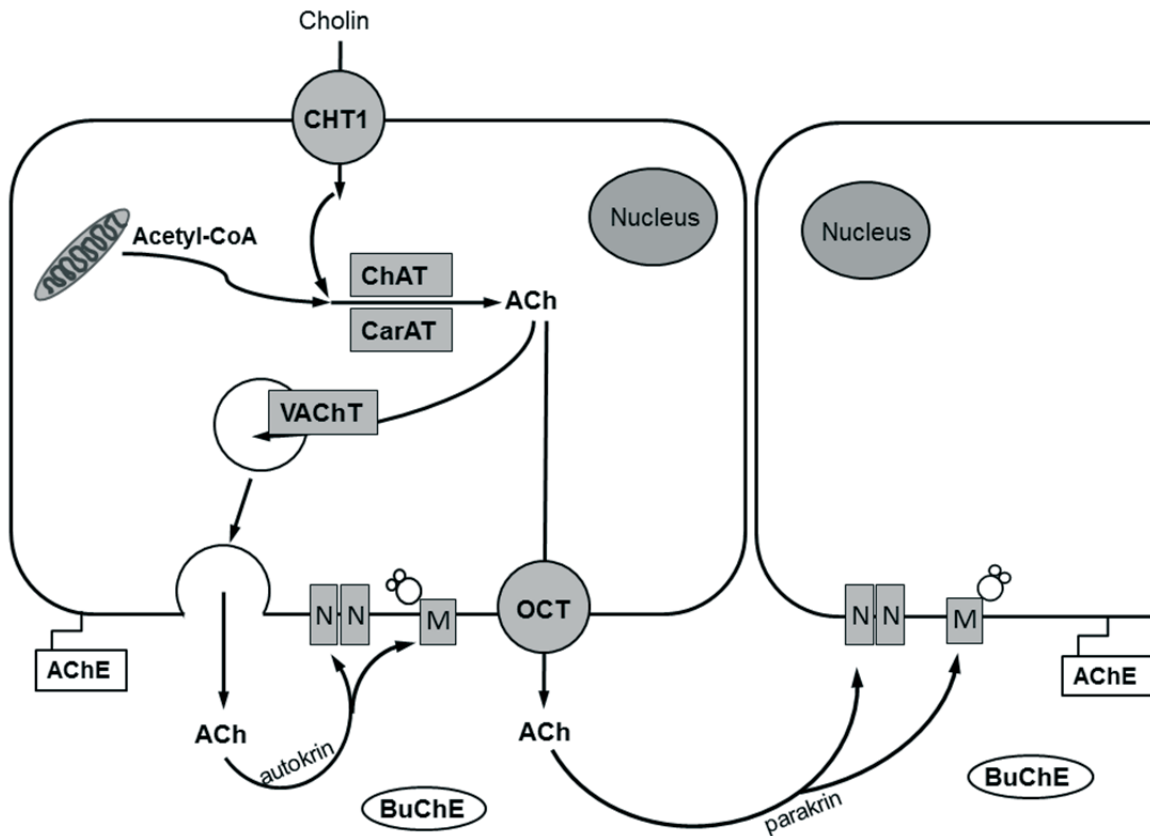
Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Acetylcholinsynthese ist die Wiederaufnahme von Cholin in das Zytoplasma der Zelle.

Im neuronalen cholinergen System (siehe Abb. 1.1) erfolgt die Aufnahme von Cholin aus dem Extrazellulärraum natriumabhängig über den hochaffinen Cholintransporter (CHT1; Okuda und Haga 2000). Auch in zahlreichen non-neuronalen Zellen, wie z. B. im Trachealepithel der Ratte (Pfeil et al. 2003), im Urothel der Ratte (Hanna-Mitchell et al. 2007) und in Keratinozyten der Haut von Mensch und Ratte (Haberberger et al. 2002) konnte die Expression des CHT1 bislang nachgewiesen werden. Während in Neuronen nach einem Knockout des CHT1 keine Acetylcholinsynthese mehr stattfindet (Übersicht: Ferguson und Blakely 2004), können non-neuronale Zellen auch bei fehlender CHT1 Aktivität immer noch Acetylcholin bilden (Song et al. 2003). Dies liegt daran, dass in non-neuronalen Zellen neben dem CHT1 noch weitere Transporter für die Aufnahme von Cholin verantwortlich sind. Da wäre zum einen die Familie der Cholin transporter-like proteins (CTL1-5) und zum anderen die der OCTs. Die CTLs transportieren Cholin natriumunabhängig und mit einer mittleren Affinität (Inazu et al. 2005). Sie werden sowohl in neuronalen Zellen als auch in zahlreichen non-neuronalen Geweben (u. a. Niere, Kolon, Lunge) exprimiert (Übersicht siehe: Traiffort et al. 2013). Organische Kationentransporter (OCTs) finden, wie bereits in Kapitel 1.2.2 erwähnt, eine weite Verbreitung sowohl in neuronalem als auch in non-neuronalem Gewebe (Übersicht siehe: Koepsell et al. 2007). Die beiden Isoformen OCT1 und OCT2 binden und transportieren das organische Kation Cholin natriumunabhängig und mit niedriger Affinität (Michel et al. 2006).



**Abb. 1.1: Acetylcholin-Syntheszyklus an einer cholinergen Nervenendigung**

Acetylcholin wird im Zytoplasma durch die Cholinacetyltransferase (ChAT) aus Acetyl-CoA und Cholin synthetisiert. Acetyl-CoA stammt aus den Mitochondrien, Cholin wird über den hochaffinen Cholintransporter (CHT1) in die Zelle aufgenommen. Anschließend wird Acetylcholin mit Hilfe des vesikulären Acetylcholintransporters (VACHT) in Vesikel transportiert und dort gespeichert bis zu dessen exozytotischen Freisetzung in den synaptischen Spalt. Hier kann Acetylcholin mit nikotinergen (N) oder muskarinergen (M) Rezeptoren auf der Zielzelle interagieren. Die Inaktivierung von Acetylcholin erfolgt durch Spaltung in Acetat und Cholin mittels Acetylcholinesterase (AChE) oder Butyrylcholinesterase (BuChE). Cholin kann wieder durch den CHT1 in die Zelle aufgenommen werden und steht somit für die Acetylcholin Synthese erneut zur Verfügung. (Abbildung modifiziert nach Kummer et al. 2008)



**Abb. 1.2: Acetylcholin-Syntheszyklus in einer non-neuronalen Zelle**

Acetylcholin wird im Zytoplasma durch die Cholinacetyltransferase (ChAT) oder durch die Carnitinacetyltransferase (CarAT) aus Acetyl-CoA und Cholin synthetisiert. Acetyl-CoA stammt aus den Mitochondrien, Cholin wird über den hochaffinen Cholintransporter (CHT1) in die Zelle aufgenommen. In einigen non-neuronalen Geweben wird der vesikuläre Acetylcholintransporter (VACHT) exprimiert und vermittelt hier (möglicherweise) die Speicherung von Acetylcholin in Vesikeln, die dann durch Exozytose freigesetzt werden können. Alternativ kann Acetylcholin direkt, also ohne vorherige Speicherung, mithilfe der organischen Kationentransporter (OCTs) freigesetzt werden. Nun kann Acetylcholin mit nikotinergen (N) oder muskarinergen (M) Rezeptoren interagieren. Bei Bindung an Acetylcholinrezeptoren an der Zellmembran der freisetzenden Zelle wirkt Acetylcholin als autokriner Mediator, bei Bindung an Rezeptoren benachbarter Zellen als parakriner Mediator. Durch die Acetylcholinesterase (AChE) oder die Butyrylcholinesterase (BuChE) wird Acetylcholin in Acetat und Cholin gespalten und dadurch inaktiviert. (Abbildung modifiziert nach Kummer et al. 2008)

### 1.3 Acetylcholinrezeptoren

Bei den Acetylcholinrezeptoren handelt es sich um zwei unterschiedliche Klassen membrangebundener Proteine, die sich in ihrer Struktur, Funktion und dem zugrundeliegenden Signalübertragungssystem unterscheiden. Es gibt zum einen die ionotropen nikotineren Acetylcholinrezeptoren (benannt nach dem selektiven Agonisten Nikotin, einem Alkaloid aus der Tabakpflanze) und zum anderen die metabotropen muskarineren Acetylcholinrezeptoren (benannt nach dem selektiven Agonisten Muskarin, einem Alkaloid aus dem Fliegenpilz) (Starke 2001).

#### 1.3.1 Nikotinerge Acetylcholinrezeptoren

##### 1.3.1.1 Aufbau und Einteilung

Bei den nikotineren Acetylcholinrezeptoren handelt es sich um ligandengesteuerte Ionenkanäle. Der Ionenkanal entsteht, indem sich fünf Untereinheiten um eine Zentralspore anordnen (Abb. 1.3. B). Die Nikotinrezeptoren sind also Pentamere. Bisher sind 17 verschiedene Untereinheiten bekannt: zehn  $\alpha$ -Untereinheiten ( $\alpha 1 - \alpha 10$ ), vier  $\beta$ -Untereinheiten ( $\beta 1 - \beta 4$ ) sowie je eine  $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\varepsilon$ -Untereinheit (Kalamida et al. 2007).

Jede Untereinheit der Nikotinrezeptoren besitzt eine extrazelluläre Domäne, vier transmembranäre Domänen (TM1 - TM4) und eine intrazelluläre Domäne. Die extrazelluläre N-terminale Domäne besteht aus ~200 Aminosäuren und enthält einen sogenannten Cys-loop. Dabei handelt es sich um zwei Cystein-Reste, die durch 13 Aminosäuren voneinander getrennt sind und über eine Disulfidbrücke eine Schleife bilden (Albuquerque et al. 2009). Die extrazellulären Domänen aller Untereinheiten eines Rezeptors bilden die Liganden-Bindungsstelle für Agonisten oder kompetitive Antagonisten (Kalamida et al. 2007). Die Transmembrandomänen TM1 und TM2 sowie TM2 und TM3 sind jeweils über kurze Schleifen miteinander verbunden. Die intrazelluläre Domäne ist eine Schleife von variabler Größe und Aminosäuresequenz, die die beiden transmembranären Domänen TM3 und TM4 miteinander verbindet. Ein kurzes C-terminales, extrazelluläres Segment, das an TM4 hängt, bildet das Ende einer Untereinheit (Abb. 1.3 A). Die TM2 Domänen aller Untereinheiten sind innerhalb des Rezeptors derart angeordnet, dass sie die Pore des Rezeptors auskleiden (Albuquerque et al. 2009).

Entsprechend ihrer vorrangigen Expression werden die nikotinergen Acetylcholinrezeptoren unterteilt in den muskulären und den neuronalen Typ (Schuller 2009).

Der Muskeltyp kommt (bei Vertebraten) ausschließlich an der motorischen Endplatte vor und tritt in einer fetalen und einer adulten Isoform auf. Der nikotinerge Acetylcholinrezeptor vom Muskeltyp besteht im fetalen oder im denervierten Muskel aus zwei  $\alpha 1$ -Untereinheiten in Kombination mit  $\beta 1$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  (Raftery et al. 1980, Kalamida et al. 2007), während im adulten Muskelgewebe die  $\gamma$ -Untereinheit durch eine  $\varepsilon$ -Untereinheit ersetzt wird (Mishina et al. 1986, Witzemann et al. 1987, Kalamida et al. 2007).

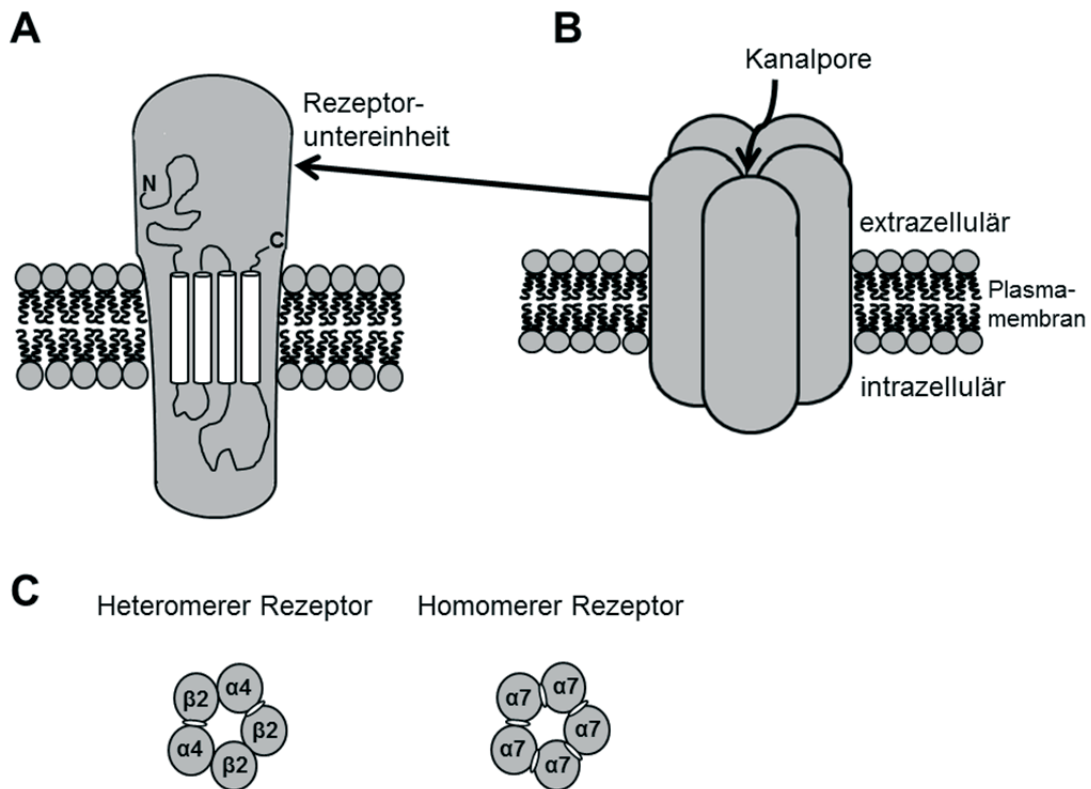
Die nikotinergen Acetylcholinrezeptoren des neuronalen Types, welche sowohl in neuronalem als auch in nicht-neuronalem Gewebe vorkommen können, setzen sich aus den 12 Untereinheiten  $\alpha 2$  -  $\alpha 10$  und  $\beta 2$  -  $\beta 4$  zusammen, wobei  $\alpha 8$  bisher nur im Huhn nachgewiesen wurde (Lindstrom et al. 1995, Lukas et al. 1999, Kalamida et al. 2007).

Die Untereinheiten  $\alpha 7$  und  $\alpha 9$  können Homopentamere bilden. Die meisten Untereinheiten lagern sich hingegen zu Heteropentameren zusammen, woraus sich eine Vielzahl verschiedener Kombinationsmöglichkeiten ergibt, von denen allerdings vergleichsweise wenige beschrieben sind (für eine Auflistung der bisher nachgewiesenen Kombinationen siehe Millar und Gotti 2009). Es müssen mindestens zwei  $\alpha$ -Untereinheiten in einem nikotinergen Rezeptor vorhanden sein, da nur diese eine Acetylcholin-Bindungsstelle enthalten. Somit haben die homopentameren nikotinergen Rezeptoren fünf Acetylcholin-Bindungsstellen, wohingegen die heteropentameren Rezeptoren, die aus zwei  $\alpha$ - und drei  $\beta$ -Untereinheiten aufgebaut sind, nur zwei Acetylcholin-Bindungsstellen aufweisen (Abb. 1.3 C; Gotti und Clementi 2004). Die  $\beta$ -Untereinheiten regulieren die Bindung von Agonisten und Antagonisten an den Rezeptor und deren Dissoziation vom Rezeptor (Gotti und Clementi 2004). Die Kombination der Untereinheiten bedingt also die pharmakologische Charakteristik und die Funktion der jeweiligen Rezeptoren. Desweiteren bestimmt sie die selektive Permeabilität für verschiedene Kationen.

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Fähigkeiten Liganden zu binden, können die neuronalen nikotinergen Acetylcholinrezeptoren weiter unterteilt werden in  *$\alpha$ -Bungarotoxin-sensitive* Rezeptoren und in *nicht- $\alpha$ -Bungarotoxin-sensitive*



Rezeptoren. Die  $\alpha$ -Bungarotoxin-sensitiven Rezeptoren sind entweder Homopentamere aus  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$  oder  $\alpha 9$ -Untereinheiten oder Heteropentamere, die aus  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$  oder  $\alpha 10$ -Untereinheiten zusammengesetzt sind. Resistent gegen  $\alpha$ -Bungarotoxin sind Heteropentamere, die aus den Untereinheiten  $\alpha 2 - \alpha 6$  und  $\beta 2 - \beta 4$  bestehen (Gotti und Clementi 2004).



**Abb. 1.3: Organisation und Struktur der nikotinergen Acetylcholinrezeptoren**

(A) Schematische Darstellung einer Rezeptoruntereinheit mit dem extrazellulären N-Terminus, den vier Transmembrandomänen (TM1 - TM4) und kurzen hydrophilen Schleifen, die TM1 und TM2 sowie TM2 und TM3 verbinden. Die große intrazelluläre Schleife verbindet TM3 und TM4. An TM4 hängt das C-terminale Fragment. (B) Schematische Darstellung des pentameren Aufbaus eines nikotinergen Acetylcholinrezeptors. (C) Schematische Darstellung eines Querschnitts durch einen heteromeren Rezeptor mit zwei Liganden-Bindungsstellen (links) und durch einen homomeren Rezeptor mit fünf Ligandenbindungsstellen (rechts). (Schema modifiziert nach Gotti und Clementi 2004)

### 1.3.1.2 Signaltransduktion

Der nikotinerge Acetylcholinrezeptor kann in drei unterschiedlichen Konformationen vorliegen, und zwar aktivierbar-geschlossen, aktiv-geöffnet und desensitiviert-geschlossen. Die Bindung eines Agonisten führt zu einer Konformationsänderung, d. h. der Rezeptor geht vom aktivierbaren, geschlossenen Zustand in den aktiven, geöffneten über und wird dadurch für Kationen (v. a.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ) durchlässig. Anschließend geht der Rezeptor in den desensitivierten und geschlossenen Zustand über und ist nicht mehr durch Agonisten stimulierbar. Die Übergänge zwischen den verschiedenen Konformationen sind reversibel. Nach Übergang vom desensitivierten in den ruhenden Zustand kann der Nikotinrezeptor erneut durch Bindung eines Agonisten aktiviert werden (Dani 2001).

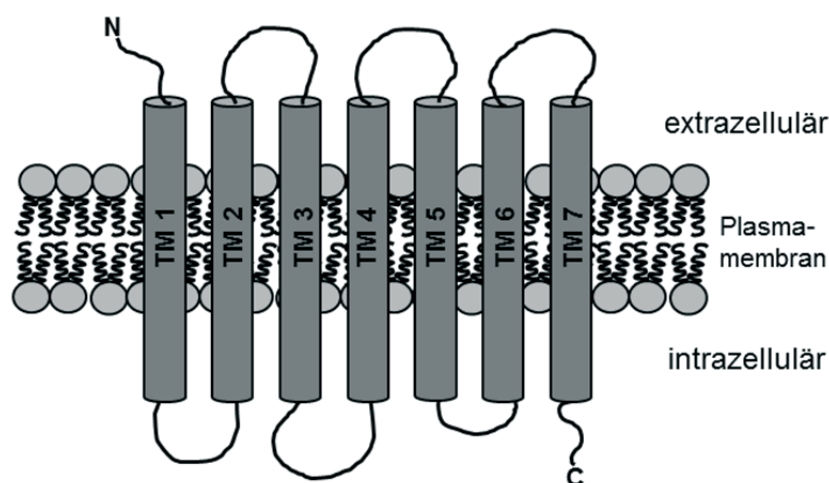
Die unterschiedlichen Kombinationen der Untereinheiten beeinflussen die Eigenschaften der Nikotinrezeptoren, wie z. B. die Permeabilität für Kationen. Die  $\alpha$ -Bungarotoxin-bindenden Rezeptoren (z. B.  $\alpha 9$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9\alpha 10$ ) sind besonders permeabel für die divalenten Kationen  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , können aber auch monovalente Kationen wie  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  transportieren (Fucile 2004). Im Gegensatz dazu sind die nicht- $\alpha$ -Bungarotoxin-bindenden neuronalen nikotinergen Rezeptoren sowie die Nikotinrezeptoren vom Muskeltyp hoch permeabel für  $\text{Na}^+$  und zeigen eine geringere Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$  (Albuquerque et al. 2009, Gotti und Clementi 2004).

Der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  nach der Rezeptoraktivierung führt zu einer Änderung des Membranpotentials und zum anderen über Stimulation intrazellulärer Signalkaskaden zu einer Beeinflussung der Zellfunktion, wie z. B. der Freisetzung von Transmittern (Wonnacott 1997), der Genexpression (Kalamida et al. 2007, Gueorguiev et al. 1999) oder des Zellmetabolismus (Kalamida et al. 2007). Ein Nikotinrezeptor-vermittelter Einstrom von  $\text{Na}^+$  in die Zelle führt zu einer Depolarisation der Zellmembran. Bei erregbaren Zellen kann, sofern die Depolarisation überschwellig ist, durch die Aktivierung spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum initiiert werden.

### 1.3.2 Muskarinerge Acetylcholinrezeptoren

#### 1.3.2.1 Aufbau und Einteilung

Bei den muskarinergen Acetylcholinrezeptoren handelt es sich um metabotrope, G-Protein gekoppelte Rezeptoren, von denen bisher fünf Subtypen (M1 - M5) identifiziert wurden. Ein muskarinerges Rezeptor besteht aus einem einzigen zusammenhängenden Glykoprotein, welches sieben hydrophobe Transmembrandomänen bildet (Abb. 1.4). Diese sind durch drei intra- und drei extrazelluläre, hydrophile Schleifen untereinander verbunden. Das N-terminale Ende des Rezeptorproteins ist extrazellulär lokalisiert, während das C-terminale Ende intrazellulär liegt. Die Liganden-Bindungsstelle befindet sich extrazellulär (Felder 1995). Die muskarinergen Acetylcholinrezeptoren sind nicht dauerhaft an G-Proteine gekoppelt. Erst die Bindung eines Agonisten, z. B. von Acetylcholin oder Muskarin, an den Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung und ermöglicht dadurch eine Interaktion mit den G-Proteinen. Bei den G-Proteinen handelt es sich um heterotrimere, intrazellulär an der Zellmembran lokalisierte Proteine, die aus den Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  aufgebaut sind. Nach den  $\alpha$ -Untereinheiten können die G-Proteine in vier Subfamilien unterteilt werden, nämlich  $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha i/o}$ ,  $G_{\alpha q/11}$  und  $G_{\alpha 12/13}$  (Neves et al. 2002). Die M1-, M3- und M5-Rezeptoren sind mit  $G_{\alpha q/11}$  gekoppelt, die M2- und M4-Rezeptoren mit  $G_{\alpha i/o}$  (Tobin et al. 2009).



**Abb. 1.4: Schematische Darstellung eines muskarinergen Acetylcholinrezeptors**

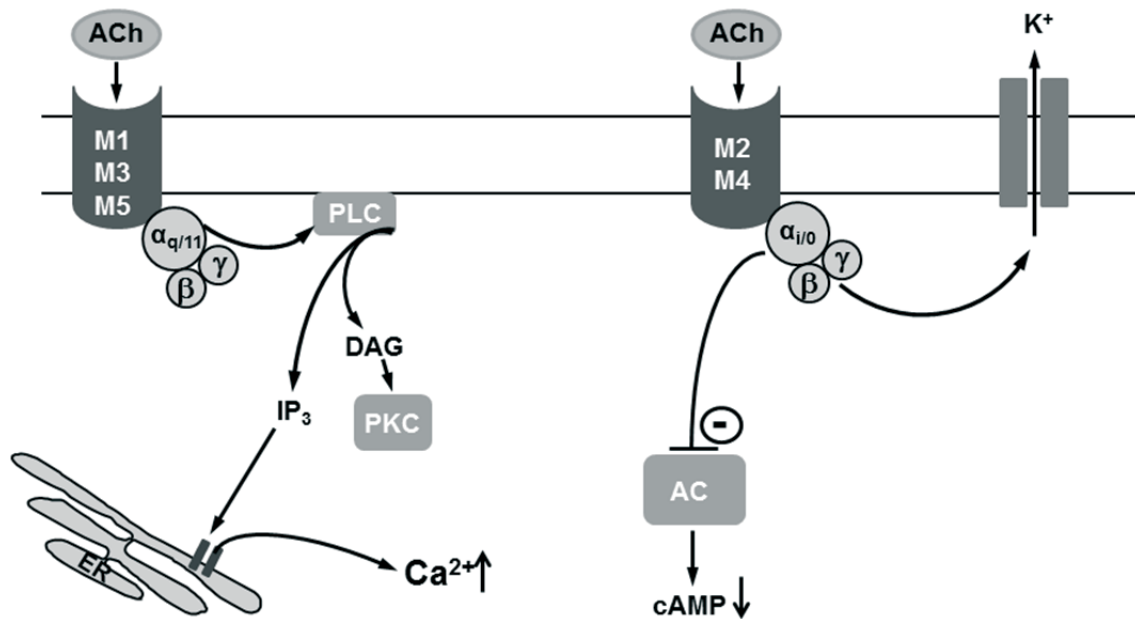
Der Rezeptor ist aus sieben hydrophoben Transmembrandomänen (TM) aufgebaut, die durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre hydrophile Schleifen untereinander verbunden sind. Das N-terminale Ende ist extrazellulär lokalisiert, das C-terminale Ende intrazellulär.

### 1.3.2.2 Signaltransduktion

Durch die Bindung eines muskarinergen Agonisten und der darauf folgenden Aktivierung des entsprechenden G-Proteins werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert (Abb. 1.5).

*M1*-, *M3*- und *M5*-muskarinerge Acetylcholinrezeptoren sind mit  $G_{\alpha q/11}$  gekoppelt, welches die membranständige Phospholipase C- $\beta$  (PLC $\beta$ ) aktiviert (Felder 1995). Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), einem Bestandteil der Zellmembran, zu Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG). IP<sub>3</sub> diffundiert zum glatten endoplasmatischen Retikulum und bindet dort an IP<sub>3</sub>-Rezeptoren. Dadurch kommt es zu einer Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol. Diacylglycerol aktiviert die Proteinkinase C, die wiederum zahlreiche Zielproteine phosphoryliert. Welche Proteine im speziellen durch die Proteinkinase C aktiviert werden, ist abhängig vom Zelltyp.

*M2*- und *M4*-muskarinerge Acetylcholinrezeptoren sind mit dem  $G_{\alpha i}$ -Protein gekoppelt, dessen Aktivierung zu einer Hemmung der Adenylatcyclase führt. Dadurch sinkt die Konzentration des intrazellulären Signalmoleküls cAMP (Tobin et al. 2009). Darüber hinaus bewirkt eine *M2*- und *M4*-Rezeptor-Aktivierung eine verlängerte Öffnung von K<sup>+</sup>-Kanälen (Eglen 2006).



**Abb. 1.5: Signalkaskade der muskarinergen Acetylcholinrezeptoren**

Linke Seite: Die Isotypen M1, M3 und M5 sind an G<sub>q</sub>/11 gekoppelt. Bei Bindung eines Agonisten, wie Acetylcholin (ACh), an diese Rezeptoren wird die Phospholipase C (PLC) aktiviert. Das führt zur Bildung von Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> bindet an IP<sub>3</sub>-Rezeptoren am endoplasmatischen Retikulum (ER), was eine Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> aus diesem zur Folge hat. Dadurch kommt es zu einem Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC).

Rechte Seite: Die Isotypen M2 und M4 sind an G<sub>i</sub>/o gekoppelt. Die Aktivierung des Rezeptors durch Bindung eines Agonisten, wie z. B. Acetylcholin, führt zu einer Hemmung der Adenylatcyclase (AC) und damit zu einer Hemmung der Synthese von cAMP. Desweiteren kommt es zu einer verlängerten Öffnung von K<sup>+</sup>-Kanälen.

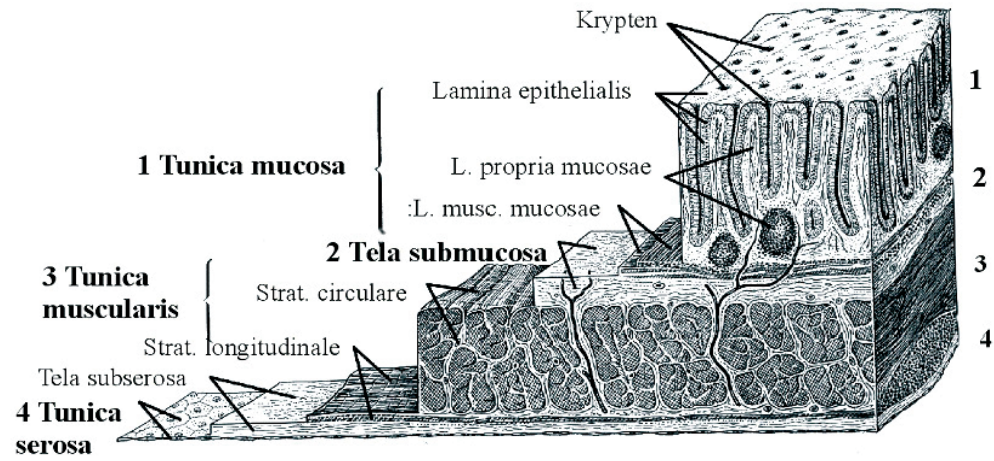
### 1.4 Das Kolon

#### 1.4.1 Anatomie und Histologie der Darmwand

Der Dickdarm setzt sich bei den Säugetieren aus Caecum, Kolon und Rektum zusammen. Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden am Kolon der Ratte durchgeführt, welches sich makroskopisch in die folgenden Abschnitte gliedert: proximales Kolon (Colon ascendens), große Flexur (Colon transversum) und distales Kolon (Colon descendens), welches in das Rektum übergeht. Das proximale Kolon ist durch eine palmblättrartige Querstreifung der Schleimhaut gekennzeichnet und dadurch vom distalen Kolon leicht zu unterscheiden, denn dieses weist eine längs gefaltete Schleimhaut auf (Lindström et al. 1979). Der Übergang vom distalen Kolon in das Rektum wird durch einen großen Lymphknoten markiert (Lindström et al. 1979).

Die Wand des Kolons ist aus mehreren Schichten aufgebaut (Abb. 1.6). Die *Tunica mucosa* (Schleimhaut; 1 in Abb. 1.6) setzt sich aus der Lamina epithelialis mucosae, der Lamina propria mucosae und der Lamina muscularis mucosae zusammen. Die Lamina epithelialis mucosae bildet dicht nebeneinander liegende, bis tief in die Lamina propria mucosae reichende, schlauchförmige Einstülpungen, die sogenannten Lieberkühnschen Krypten. Die Lamina propria mucosae ist eine bindegewebige Schicht, die der Lamina epithelialis als Stützschicht dient und Blutgefäße und Lymphfollikel enthält. Unterhalb davon befindet sich die Lamina muscularis mucosae, die aus glatten Muskelzellen besteht.

Die *Tela submucosa* (2 in Abb. 1.6) ist eine Schicht aus lockerem Bindegewebe, die Blut- und Lymphgefäße sowie den Plexus submucosus (Meissner-Plexus) enthält. Die *Tunica muscularis* (3 in Abb. 1.6) besteht aus zwei Schichten glatter Muskulatur, dem Stratum circulare (zirkulärer Verlauf der Muskelbündel) und dem Stratum longitudinale (mit longitudinaler Verlauf der Muskelbündel). Zwischen beiden befindet sich das Nervenplexus des Plexus myentericus (Auerbach-Plexus). Auf die Muskelschicht folgt die *Tunica serosa* (4 in Abb. 1.6).



**Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Kolonwand unter Lupenvergrößerung**  
L. = Lamina; Strat. = Stratum (Sobotta und Becher 1972)

### 1.4.2 Das Kolonepithel

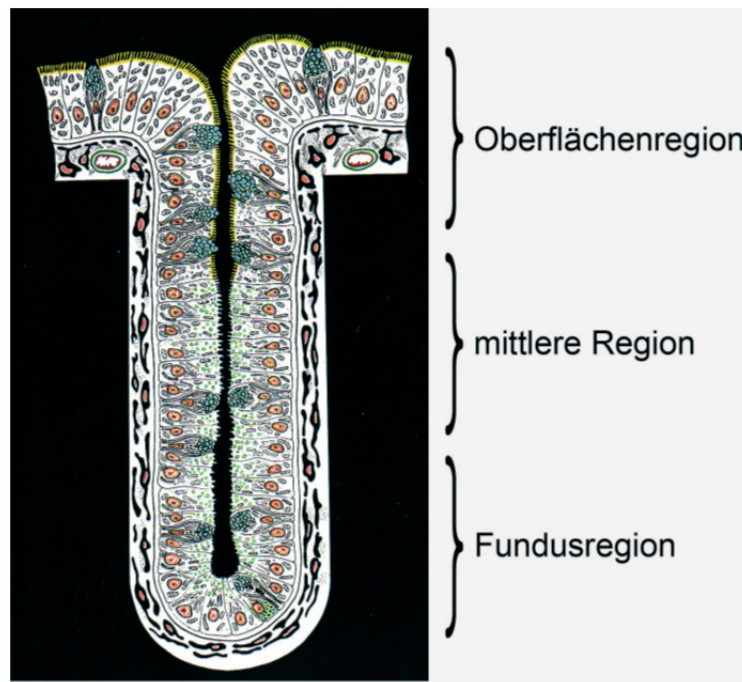
Da bei der vorliegenden Arbeit das Kolonepithel, also die Lamina epithelialis mucosae, im Fokus steht, soll dieses im Folgenden detaillierter beschrieben werden.

Wie bereits erwähnt, bildet das Kolonepithel zahlreiche dicht nebeneinander liegende schlauchförmige Einstülpungen, die Krypten. Sowohl auf der Kolonoberfläche als auch innerhalb der Krypten besteht das Kolonepithel aus verschiedenen hochprismatischen Epithelzelltypen. Die Enterozyten machen den größten Anteil aus und bilden somit die Grundlage des Epithels. Sowohl auf der Kolonoberfläche als auch im oberen Bereich der Krypten sind diese mit einem dichten Bürstensaum aus Mikrovilli besetzt und werden hier deshalb auch Saumzellen genannt. Der Bürstensaum vergrößert die mukosale Kolonoberfläche um den Faktor 30, wodurch die Resorptionskapazität um ein Vielfaches erhöht wird. Ein weiterer Zelltyp des Kolonepithels sind die Becherzellen. Je weiter man der Kolonachse nach distal folgt, desto höher wird der Anteil der Becherzellen. Diese sezernieren eine muzinhaltige Flüssigkeit, die dem Weitertransport der Ingesta und dem Schutz der epithelialen Oberfläche dient (Potten et al. 1997). Desweiteren existieren in geringer Anzahl enteroendokrine Zellen im Kolonepithel. Diese Zellen sezernieren verschiedene Hormone wie z. B. Somatostatin, Glucagon, und Serotonin (Specht 1977, Dockray 2006).

Wie in Abbildung 1.7 dargestellt, lassen sich die Zellen der Krypten in drei verschiedene Regionen einteilen, nämlich Fundus, Mitte und Oberfläche (Greger et al. 1997). Diese Einteilung erfolgt sowohl nach dem Differenzierungsgrad der Zellen als auch funktionell, da die sezernierenden Zellen in der Tiefe der Krypte bei der Reifung zum Oberflächenepithel auch die Fähigkeit gewinnen, Ionen zu resorbieren.

Die Epithelzellschicht des Kolons unterliegt einer ständigen Erneuerung. Alle epithelialen Zellen werden von Stammzellen, die im Bereich des Fundus der Krypten sitzen, hervorgebracht. Im Verlaufe ihrer Reifung wandern die Zellen vom Fundus über die Mitte bis zur Oberfläche der Kolonschleimhaut, differenzieren sich dabei und erlangen so ihre spezifische Funktion (Barrett und Keely 2000). Nach einer speziesspezifischen Zeit kommt es zur natürlichen Apoptose und anschließend zum Abschilfern der Zellen in das Darmlumen (Potten et al. 1997). Ein solcher Zyklus dauert beim Nager 2 - 3 Tage (Lipkin 1985).





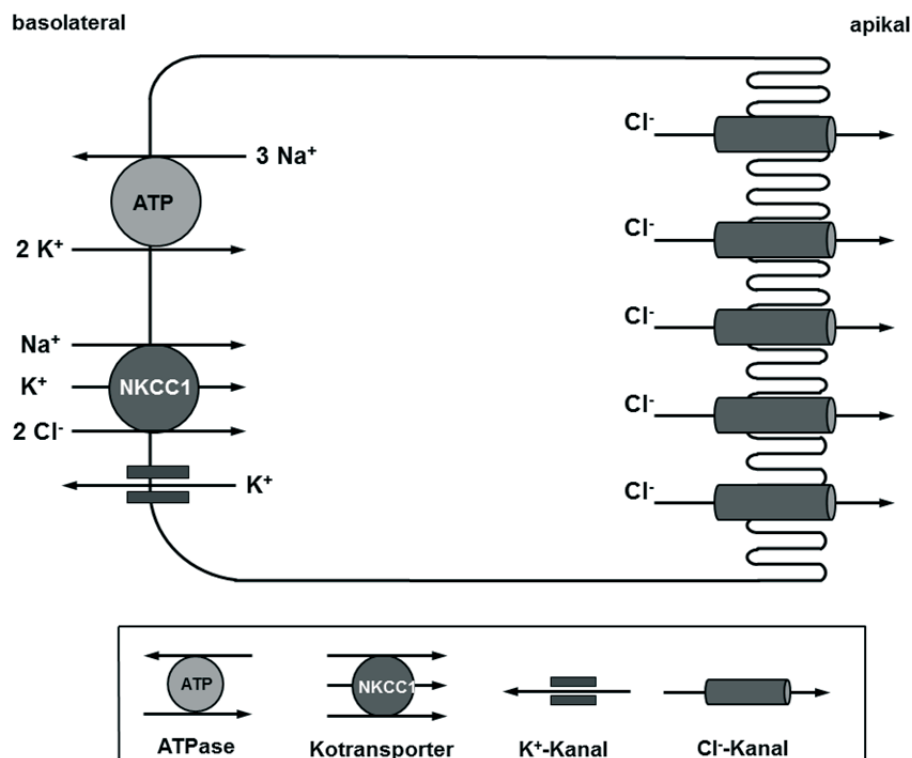
**Abb. 1.7: Halbschematische Darstellung einer Lieberkühnschen Krypte**  
Longitudinaler Schnitt (Specht 1977)

### 1.4.3 Funktionen des Kolonepithels

Das Kolonepithel bildet eine Grenzfläche zwischen der „Außenwelt“, also dem Darmlumen und dem Körperinneren (Interstitium und Kapillaren). Daraus ergibt sich zum einen eine Barrierefunktion des Epithels, d. h. unter physiologischen Bedingungen wird das Eindringen von luminalem Material (z. B. Mikroorganismen) in den Körper verhindert. Eine weitere sehr wichtige Funktion des Kolonepithels ist der transepitheliale Transport von Nährstoffen, Elektrolyten und Wasser mittels Resorption und Sekretion. Transport- und Barrierefunktion sorgen gemeinsam für die Aufrechterhaltung eines physiologischen Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushaltes und der Abwehr von extrinsischen Antigenen (Potten et al. 1997, Hirota und McKay 2006). Resorption und Sekretion werden durch verschiedene Signalstoffe beeinflusst, die an membranständige Rezeptoren der Epithelzellen binden. Acetylcholin ist einer dieser Signalstoffe und an der Regulation der Sekretion beteiligt. Aus diesem Grund wird im Folgenden näher auf die Sekretionsmechanismen am Kolon und deren Aktivierung durch Acetylcholin eingegangen.

#### 1.4.4 Sekretionsmechanismen am Kolon

Sezerniert werden im Kolon vor allem  $\text{Cl}^-$ -Ionen in Form von  $\text{KCl}$  und  $\text{NaCl}$ . Die Antriebskraft hierfür liefert die basolateral lokalisierte  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase, die  $\text{K}^+$ -Ionen im Austausch gegen  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Enterozyten bringt (Abb. 1.8). Der dadurch entstehende Konzentrationsgradient für  $\text{Na}^+$  dient als Antriebskraft für den sekundär aktiven  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$ -Cotransporter (NKCC1; Barrett und Keely 2000), der eine weitere Aufnahme von  $\text{K}^+$  gemeinsam mit  $\text{Cl}^-$ -Ionen in die Zelle vermittelt.  $\text{Cl}^-$  akkumuliert in der Zelle über sein elektrochemisches Gleichgewicht hinaus. Dazu kommen basolateral lokalisierte  $\text{K}^+$ -Kanäle, über die  $\text{K}^+$ -Ionen aus der Zelle ausströmen und so einen elektrischen Gradienten für  $\text{Cl}^-$ , sprich ein negatives Membranpotential, aufbauen (Barrett und Keely 2000). Sobald sich in der apikalen Membran  $\text{Cl}^-$ -Kanäle öffnen, werden  $\text{Cl}^-$ -Ionen in das Kolonlumen sezerniert. Um einen Ladungsausgleich zu gewährleisten, folgt der  $\text{Cl}^-$ -Sekretion ein parazellulärer Ausstrom von  $\text{Na}^+$ -Ionen. Wasser folgt den Elektrolyten osmotisch auf trans- oder parazellulärem Weg in das Kolonlumen (Barrett und Keely 2000).



**Abb. 1.8:** Schematische Darstellung der wichtigsten Mechanismen zur Chloridsekretion

### 1.4.5 Cholinerge Regulation des Ionentransportes im Kolon

Acetylcholin, welches z. B. von cholinergen Neuronen des Plexus submucosus freigesetzt wird (siehe z. B. Harrington et al. 2010), löst eine Sekretion am Darmepithel aus. Dazu bindet es am Kolonepithel an muskarinerge M3 (sowie M1) Rezeptoren (Haberberger et al. 2006). Bei diesen handelt es sich, wie in Kapitel 1.3.2 bereits beschrieben, um Gαq/11 gekoppelte Rezeptoren. Das bedeutet, dass eine Stimulation des Rezeptors über Aktivierung der Phospholipase C-β und darauf folgender IP<sub>3</sub>-Produktion zur Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus intrazellulären Organellen wie dem endoplasmatischen Retikulum und somit zu einem Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt. Dies wird über IP<sub>3</sub>-Rezeptoren vermittelt, von denen die Subtypen IP<sub>3</sub>R2 und IP<sub>3</sub>R3 am Epithel nachgewiesen wurden (Siefjediers et al. 2007). Nach Entleerung der intrazellulären Speicherorganellen folgt ein kapazitativer Ca<sup>2+</sup>-Einstrom aus dem Extrazellulärraum (Onodera et al. 2013).

Folge des Anstiegs der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ist in der Hauptsache eine Hyperpolarisation der Membran durch Aktivierung von Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Kaliumkanälen und damit eine Steigerung der Antriebskraft für den Chloridausstrom über apikale Chloridkanäle, insbesondere über den CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)-Kanal, dem wichtigsten Anionenkanal in dieser Membran (Greger 2000). Unterstützt wird dieser Cl<sup>-</sup>-Ausstrom über den CFTR durch kurzfristiges Öffnen von apikalen Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Cl<sup>-</sup>-Kanälen (Hennig et al. 2008).

### 1.4.6 Kurzkettige Fettsäuren

Bei den kurzkettigen Fettsäuren (SCFA = short chain fatty acids) handelt es sich um flüchtige Fettsäuren mit einer Kettenlänge von ein bis sechs C-Atomen (Bugaut 1987). Gebildet werden sie durch bakterielle Fermentation von Strukturkohlenhydraten im Kolon (bei Pferd und Kaninchen auch im Caecum) monogastrischer Säugetiere, da diese keine körpereigenen Enzyme zur Spaltung von  $\beta$ -glykosidischen Bindungen besitzen. Die Gesamtkonzentration an kurzkettigen Fettsäuren im Kolonlumen beträgt ungefähr 100 mmol/l (Bugaut 1987), wovon Acetat (60-75 %), Propionat (15-25 %) und Butyrat (10-15 %) den Hauptanteil ausmachen (Charney et al. 1998). Eine genaue Konzentrationsangabe ist jedoch schwierig, da diese u. a. von der Zusammensetzung der Nahrung abhängt. Kurzkettige Fettsäuren üben wichtige Funktionen für das Kolonepithel aus, denn sie sind zum einen die wichtigste Energiequelle für die Kolonozyten, außerdem beeinflussen sie die Proliferation und die Mukusbildung (Bugaut 1987, Soergel 1994).

Vor wenigen Jahren entdeckten Yajima und Kollegen, dass eine mukosale Applikation von Propionat einen Anstieg des Kurzschlussstroms, das ist ein Maß für den elektrogeneren Ionentransport durch ein Epithel, in Ussingkammer-Experimenten an der Kolonmukosa hervorruft. Es zeigte sich, dass Propionat eine Freisetzung von Acetylcholin aus dem Kolonepithel (nach basolateral) induziert. Acetylcholin wiederum sorgt über Aktivierung epithelialer Acetylcholinrezeptoren für eine Chloridsekretion, welche in der Ussingkammer als Anstieg des Kurzschlussstromes messbar ist (Yajima et al. 2011a). Da diese Sekretion resistent gegenüber dem Neurotoxin Tetrodotoxin ist, jedoch hemmbar durch den muskarinergen Antagonisten Atropin, ist davon auszugehen, dass das freigesetzte Acetylcholin aus dem Kolonepithel stammt (Yajima et al. 2011a). Die Propionat-induzierte Freisetzung von Acetylcholin wird vermutlich durch die G-Protein gekoppelten Rezeptoren GPR43 (und GPR41) vermittelt (Yajima et al. 2011b).

### 1.5 Eigene Fragestellung

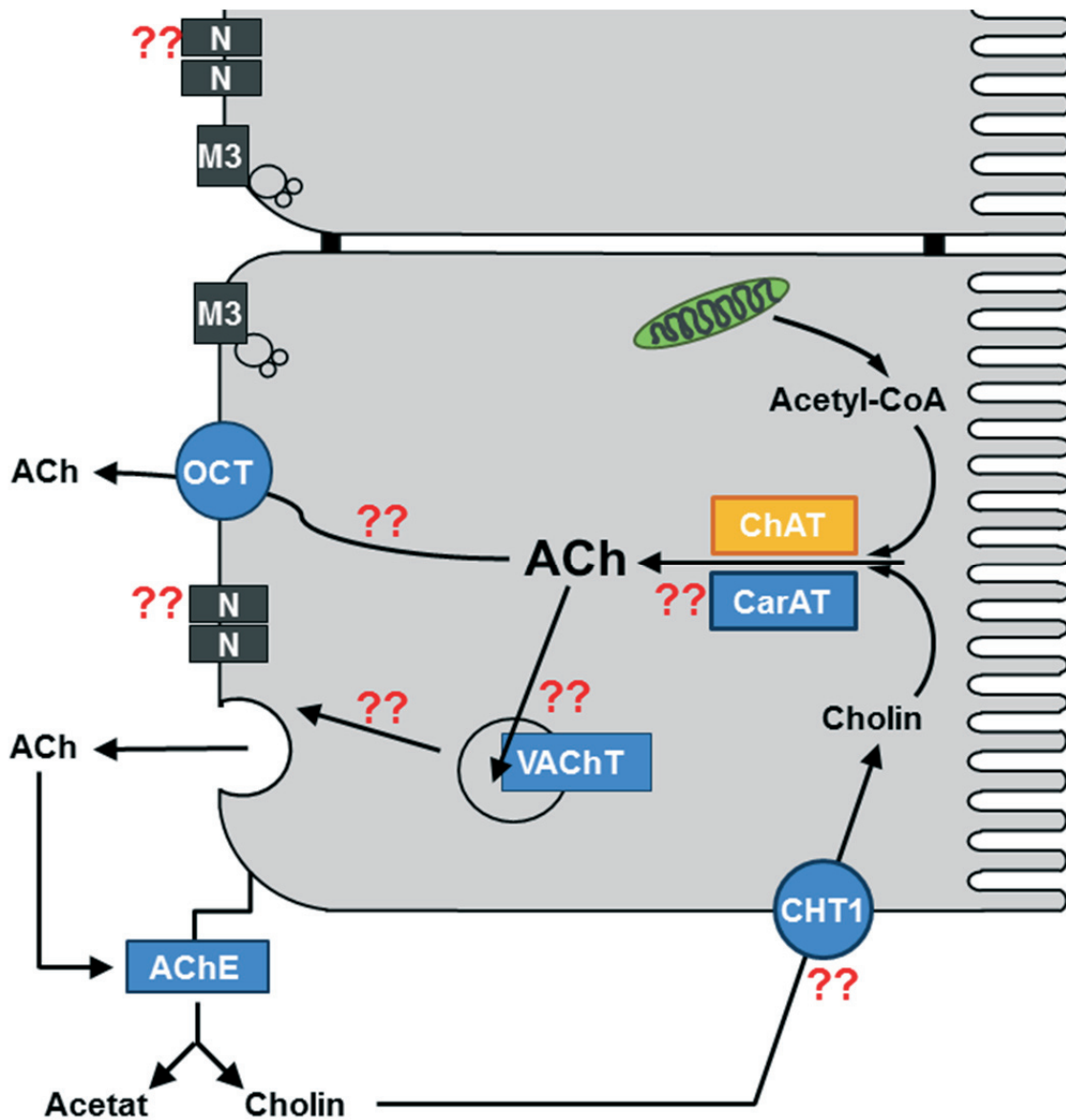
Wie bereits beschrieben, wird Acetylcholin von non-neuronalen Zellen synthetisiert und freigesetzt. Die Tatsache, dass das Kolonepithel der Ratte sowohl die ChAT exprimiert als auch Acetylcholin freisetzen kann, gibt deutliche Hinweise auf das Vorkommen eines non-neuronalen Systems in diesen Zellen. Aus welchen Enzymen und Transportern sich dieses System im speziellen zusammensetzt, ist bis jetzt nicht untersucht. Deshalb war es das Ziel dieser Studie, das non-neuronale cholinerge System am Kolonepithel der Ratte genauer zu charakterisieren.

Darüber hinaus ist bekannt, dass die ChAT nicht nur die Synthese von Acetylcholin, sondern auch von Butyrylcholin und Propionylcholin katalysieren kann. Da im Kolonlumen die entsprechenden kurzkettigen Fettsäuren als Substrate für die ChAT in hoher Konzentration zur Verfügung stehen, ist es möglich, dass solche *atypischen Cholinester* gebildet werden. Deshalb war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, ob diese *atypischen Cholinester* am Kolonepithel funktionelle Bedeutung haben.

Im Einzelnen wurden folgende Fragen gestellt:

- Welche der Proteine des Acetylcholin-Syntheszyklus werden vom Kolonepithel der Ratte exprimiert?
- Haben die nachgewiesenen Proteine eine funktionelle Bedeutung?
- Werden im Kolonepithel nikotinerge Acetylcholinrezeptoren exprimiert? Und falls ja, welche Untereinheiten?
- Haben Butyrylcholin und Propionylcholin eine funktionelle Bedeutung am Kolonepithel?

In Abb. 1.9 sind der besseren Übersicht halber die im Verlauf der Arbeit untersuchten vermuteten Proteine des Acetylcholin-Syntheszyklus dargestellt.



**Abb. 1.9: Möglicher Acetylcholin-Syntheszyklus in einer Kolonepithelzelle**

CHT1 = hochaffiner Cholintransporter, CarAT = Carnitinacetyltransferase, ChAT = Cholinacetyltransferase, VAcHT = Vesikulärer Acetylcholintransporter, OCT = Organischer Kationentransporter 1-3, ACh = Acetylcholin, AChE = Acetylcholinesterase, N = nikotinerger Acetylcholinrezeptor, M = muskarinerger Acetylcholinrezeptor

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere**

Für die Versuche im Rahmen dieses Projekts wurden männliche und weibliche Wistar-Ratten aus eigener Zucht des Instituts für Veterinär-Physiologie und -Biochemie der Justus-Liebig-Universität Gießen verwendet. Diese Tiere wurden bis vor dem jeweiligen Versuch nach Geschlechtern getrennt und in Kleingruppen in einem ganzjährig klimatisierten Raum bei 22,5 °C Raumtemperatur, 50-55 % relativer Luftfeuchtigkeit und 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Sie erhielten während der gesamten Zeit Standard-Zuchtfutter und Wasser ad libitum. Die Ussingkammer-Versuche wurden mit Ratten mit einem Körpergewicht von 160 bis 250 g durchgeführt. Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Versuche wurden Ratten mit einem Körpergewicht von 120 bis 190 g verwendet. Für die immunhistochemischen Versuche wurden Ratten mit einem Körpergewicht von 200 bis 250 g verwendet.

### **2.2 Lösungen**

#### **2.2.1 Lösungen für die Kryptenisolation**

##### **2.2.1.1 Isolationslösung**

Zur Isolation der Krypten aus dem distalen Kolon wurde eine Hanks balanced salt solution (HBSS) ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  verwendet, der 10 mmol/l EDTA (Ethylendiaminetetraessigsäure) zugesetzt war. Der pH-Wert wurde mit Tris-Base auf 7,4 eingestellt und auf einer Temperatur von 38°C gehalten.

##### **2.2.1.2 Auffangtyrode**

Die Auffanglösung für die Krypten (Böhme et al. 1991, Diener et al. 1991) war wie folgt zusammengesetzt (in mmol/l): 100 Kaliumgluconat; 30 KCl; 20 NaCl; 1,25  $\text{CaCl}_2$ ; 1  $\text{MgCl}_2$ ; 10 HEPES [N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure]; 12,2 Glucose; 5 Natriumpyruvat und 1 g/l BSA (Bovines Serumalbumin). Die Lösung wurde mit KOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

### 2.2.2 Lösungen für die Ussingkammer-Versuche

#### 2.2.2.1 Bicarbonat-gepufferte Parsonslösung (Standard)

Für die Ussingkammer-Versuche wurde eine Lösung (Parsons und Paterson 1965) mit folgender Zusammensetzung (in mmol/l) verwendet: 107 NaCl; 4,5 KCl; 25 NaHCO<sub>3</sub>; 1,8 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,25 CaCl<sub>2</sub>; 1 MgSO<sub>4</sub> und 12,2 Glucose. Der pH-Wert der Lösung wurde bei 37 °C mit NaHCO<sub>3</sub> und HCl auf 7,4 eingestellt. Wie bei allen anderen HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-gepufferten Lösungen erfolgte die pH-Einstellung unter Begasung mit Carbogen (5 % Kohlendioxid, 95 % Sauerstoff; Vol/Vol); mit diesem Gasgemisch wurden diese Pufferlösungen dann auch kontinuierlich während der Versuche begast.

#### 2.2.2.2 Chloridfreie Parsonslösung

Chlorid wurde in der Standard-Parsonslösung äquimolar durch das impermeable Anion Gluconat ausgetauscht. Die Lösung enthielt (in mmol/l): 107 NaGluc; 4,5 KGluc; 25 NaHCO<sub>3</sub>; 1,8 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,25 CaCl<sub>2</sub>; 1 MgSO<sub>4</sub> und 12,2 Glucose und wurde bei Carbogenbegasung mit NaOH/Gluconsäure auf einen pH von 7,4 titriert

#### 2.2.2.3 Calciumfreie Parsonslösung

Für die Herstellung der calciumfreien Lösung wurde CaCl<sub>2</sub> im Puffer weggelassen. Auf den zusätzlichen Einsatz eines Ca<sup>2+</sup>-Chelators wurde verzichtet.



### **2.2.3 Lösungen für die immunhistochemischen Versuche**

#### **2.2.3.1 Gelatinelösung zur Beschichtung der Objektträger**

5 g Gelatine (300 Bloom; der Bloomwert ist ein Indikator für die Gelierkraft der Gelatine) wurden in 1 Liter Aqua dest. gegeben und auf 54 °C erhitzt. Anschließend wurde 0,5 g Chromkaliumsulfat zugegeben. Nach dem Aufklaren der Lösung wurde diese auf einer Temperatur von 40 °C gehalten und filtriert.

#### **2.2.3.2 Gelatinelösung zur Gewebereinbettung**

Für die Gewebereinbettung wurden 18 g Speisegelatine in 180 ml Aqua dest. gegeben, bei 37 °C gelöst und anschließend filtriert.

#### **2.2.3.3 Phosphatpuffer (PB)**

Der Puffer war wie folgt zusammengesetzt (in mmol/l): 80  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 20  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Der pH- Wert wurde mit NaOH/HCl ohne Begasung auf 7,4 eingestellt.

#### **2.2.3.4 Paraformaldehyd-Lösung (PFA 4%)**

Es wurden 4 g Paraformaldehyd (PFA) unter ständigem Rühren bei 55 °C in 100 ml Phosphatpuffer gelöst. Nach dem Aufklaren wurde die Lösung filtriert, um eventuelle Rückstände zu entfernen. All diese Arbeitsschritte wurden unter einem Abzug durchgeführt. Lichtgeschützt und bei +4 °C aufbewahrt konnte die PFA-Lösung bis zu 2 Wochen lang verwendet werden.

#### **2.2.3.5 Blocking-Lösung**

Für die Blocking-Lösung wurden 2 ml/l Triton-X-100, 30 g/l BSA und 100 ml/l NDS (normal donkey serum; Eselserum) in 100 mmol/l Phosphatpuffer gelöst.

### **2.2.3.6 Primärantikörperlösungen**

Der jeweilige Primärantikörper wurde in entsprechender Konzentration (siehe Tab. 2.1) folgender Lösung zugesetzt: 1 ml/l Triton-X-100, 5 g/l Milchpulver, 10 g/l BSA und 1 ml/l NDS gelöst in Phosphatpuffer.

### **2.2.3.7 Sekundärantikörperlösungen**

Der jeweilige Sekundärantikörper wurde in entsprechender Konzentration (siehe Tab. 2.2) folgender Lösung zugesetzt: 1 ml/l Triton-X-100, 5 g/l Milchpulver und 10 g/l BSA gelöst in Phosphatpuffer.

### **2.2.3.8 DAPI-Lösung**

Zur Färbung der Zellkerne wurde DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) verwendet. Die Stammlösung (10,9 mmol/l) wurde aus 10 mg DAPI und 2 ml Aqua dest. hergestellt. Durch Mischen von 6,9 µl Stammlösung mit 250 ml Phosphatpuffer erhielt man die Gebrauchslösung mit einer Endkonzentration von 300 nmol/l. Die Gebrauchslösung wurde bei +4 °C im Kühlschrank lichtgeschützt aufbewahrt.

### **2.2.4 Lösungen für die $\text{Ca}^{2+}$ -Imagingversuche**

#### **2.2.4.1 Fura-2 AM-Lösung**

1 mg Fura-2 AM (Fura-2-acetoxymethylester; Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) wurde in 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, aliquotiert und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Lösung zum Aufladen basierte auf derselben Lösung, die zur Aufbewahrung der Zellen bzw. Krypten verwendet wurde. Der entsprechenden Lösung wurden  $3\text{ }\mu\text{mol/l}$  Fura-2 AM und  $0,5\text{ g/l}$  Pluronic acid (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) zugesetzt. Pluronic acid fungiert als Detergenz, welches die Löslichkeit von Fura-2 AM verbessert. Diese Lösung wurde für jeden Versuchstag frisch hergestellt.

#### **2.2.4.2 Standard-Tyrodelösung**

Die während der  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Versuche perfundierte Lösung war eine Standard-Tyrodelösung folgender Zusammensetzung (in mmol/l):  $140\text{ NaCl}$ ;  $5,4\text{ KCl}$ ;  $1\text{ CaCl}_2$ ;  $1\text{ MgCl}_2$ ;  $10\text{ HEPES}$  und  $12,2\text{ Glucose}$ . Der pH-Wert wurde mit NaOH auf  $7,4$  eingestellt.

#### **2.2.4.3 $\text{Ca}^{2+}$ -freie Tyrodelösung**

Als  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Lösung wurde eine modifizierte Standard-Tyrodelösung verwendet, bei der  $\text{CaCl}_2$  weggelassen wurde; auf die Zugabe eines Chelators wurde verzichtet.

### 2.2.5 Lösungen für die Enzymhistochemie

#### 2.2.5.1 Maleatpuffer

Zur Rehydrierung der Gefrierschnitte wurde ein Natriumhydrogenmaleat-Puffer mit einer Konzentration von 100 mmol/l verwendet. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 6,0 eingestellt.

#### 2.2.5.2 Citratpuffer

Für die Herstellung des Inkubationsmediums wurde ein Citratpuffer. Dieser wurde wie folgt hergestellt: 65 ml einer Trinatriumcitrat-Lösung (100 mmol/l) wurden zu 35 ml Zitronensäure (100 mmol/l) gegeben und der pH-Wert mit Zitronensäure/NaOH auf 5 eingestellt.

#### 2.2.5.3 Inkubationslösung

Von den einzelnen Substanzen wurden Stocklösungen in Aqua dest. hergestellt und aus diesen Lösungen das Inkubationsmedium wie folgt in der angegebenen Reihenfolge zusammengesetzt.

Citratpuffer (100 mmol/l, siehe Kap. 2.2.5.2)	915 ml/l
Kupfersulfat-Lösung (100 mmol/l)	25 ml/l
Kaliumferricyanid-Lösung (100 mmol/l)	50 ml/l
Acetylthiocholinchlorid-Lösung (100 mmol/l)	10 ml/l

### 2.3 Substanzen

Bumetanid und Forskolin wurden in Ethanol gelöst (maximale Ethanolkonzentration 2.5 ml/l). Calmidazolium, Corticosteron, Cyclopiazonsäure (Alexis, Grünberg, Deutschland), Darifenacin, J104129 (Tocris) und Trifluoperazin, wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO; maximale DMSO-Konzentration 2.8 ml/l) gelöst. Tetrodotoxin war in  $2 \cdot 10^{-2}$  mol/l Citratpuffer gelöst. Acetylthiocholinchlorid, Atropinsulfat, Bromoacetylcholin, Butyrylcholin, Carbachol, Cholinchlorid, Dimethylphenylpiperazinium, Eserin, Hemicholinium-3, Hexamethonium, Mildronat, Natriumpropionat, Nikotintartrat, Pirenezepin, Propionylcholin, Telenzepin und Vesamicol wurden in wässrigen Stammlösungen angesetzt.

Zur Säureaktivierung von Omeprazol (angesetzt als 25 mmol/l Stammlösung in DMSO) wurden 100 µl der Omeprazol-Stammlösung mit 900 µl einer 0,1 mol/l HCl für 15 min inkubiert und dann mit 10,9 mg TRIS neutralisiert.

Sofern nicht anders angegeben, stammten die Substanzen von Sigma (Taufkirchen, Deutschland).

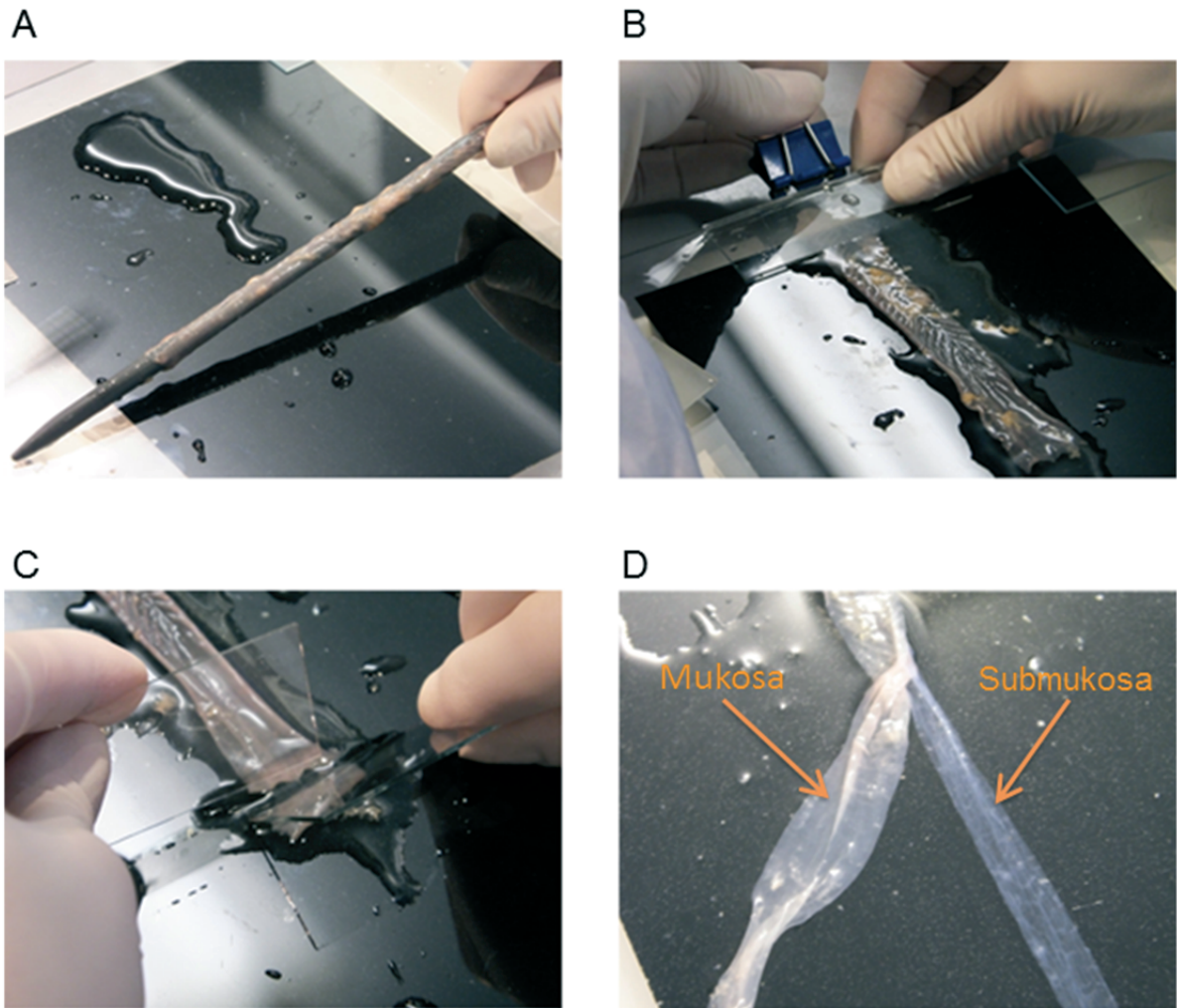
### 2.4 Gewebepräparation

#### 2.4.1 Herstellung der Mukosa-Submukosa-Präparate

Zunächst wurden die Ratten mit einem Isofluran-Luftgemisch betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation und Herzschnitt getötet (genehmigt durch das Regierungspräsidium Gießen). Anschließend wurde das Abdomen entlang der Linea alba eröffnet. Für einen besseren Zugang zur Bauchhöhle wurde zu beiden Seiten entlang der Rippenbögen ein Entlastungsschnitt angelegt. Das Kolon wurde vorsichtig vorgelagert und zunächst an seinem distalen Ende proximal des Lymphknotens, der den Übergang zum Rektum markiert (Lindström et al. 1979), mit einer Schere abgesetzt. Anschließend wurde das Mesenterium stumpf abpräpariert und das Kolon an seinem proximalen Ende, am Übergang zum Caecum, abgeschnitten. Sofort nach der Entnahme wurde das Darmstück in eisgekühlter, Carbogen-begaster Parsonslösung bzw. in Standard-Tyrode gelagert. Dadurch entspannte sich die Muskulatur und das Darmlumen konnte mithilfe einer Spritze mit oben genannter Parsonslösung gespült und somit von Rückständen befreit werden. Im Anschluss wurde das Darmstück auf einen Kunststoffstab (Durchmesser von 5 mm) gezogen und mithilfe eines stumpfen Skalpells am distalen Ende eine zirkuläre Inzision gesetzt. Nun konnten die Serosa und die Muscularis propria vorsichtig von distal nach proximal abpräpariert werden. Das so entstandene Mukosa-Submukosa-Präparat bestand noch aus folgenden Schichten (von serosal nach mukosal): Tela submucosa, Lamina muscularis mucosae, Lamina propria mucosae und Lamina epithelialis. Die Mukosa-Submukosa-Präparate wurden am Mesenterialansatz der Länge nach mittels Skalpell aufgetrennt. Diese Präparate wurden für die Kryptenisolation und einen Teil der Ussingkammer-Versuche benötigt.

### 2.4.2 Herstellung der Mukosa-Präparate

Zunächst wurde ein Mukosa-Submukosa-Präparat, wie unter Kapitel 2.4.1 beschrieben, hergestellt. Anschließend wurde das Gewebe mit der mukosalen Seite nach oben flach auf einer eisgekühlten Glasplatte ausgebreitet und das Gewebe mit Parsonslösung umspült. Das Kolon wurde mithilfe zweier Objektträger und Metallclipse auf der Glasplatte fixiert (siehe Abb. 2.1 B). Am distalen Ende des Kolons wurde nun die Mukosa mit der scharfen Kante eines frischen Objektträgers eingeschnitten, wobei auf die Einhaltung einer korrekten Schnitttiefe geachtet werden musste, um die Mukosa von der darunterliegenden Submukosa exakt trennen zu können (siehe Abb. 2.1 C). Bei zu geringer Tiefe des Einschnittes konnte die Mukosa nicht vollständig abpräpariert werden, bei einem zu tiefen Einschnitt dagegen wurde das gesamte Gewebe durchtrennt. Daraufhin konnte die Mukosa vorsichtig mithilfe des Objektträgers in Richtung proximales Kolonende von der Submukosa abgezogen werden (siehe Abb. 2.1 D). Um ein Einreißen der Submukosa zu verhindern, musste das Gewebe dabei leicht gespannt werden, ohne es jedoch zu hohen Zugbelastungen auszusetzen. Am Übergang vom distalen zum proximalen Kolon, deutlich zu erkennen an dessen typischer Streifung der Schleimhaut (Lindström et al. 1979), wurde die Mukosa schließlich mit einem Skalpell vom restlichen Gewebe getrennt. Die Mukosa-Präparate wurden für einen Großteil der Ussingkammer-Versuche verwendet. Für die Präparation der Mukosa hat es sich bewährt, Ratten bis zu einem Gewicht von 200 g zu verwenden.



**Abb. 2.1: Herstellung eines Mukosapräparates:**

- A:** Mukosa-Submukosa Präparat auf einem Kunststoffstab.
- B:** Das Gewebe wird flach auf einer Glasplatte ausgebreitet und von Puffer umspült.
- C:** Die Mukosa wird mithilfe eines Objektträgers vorsichtig eingeschnitten.
- D:** Links im Bild die fertig präparierte Mukosa, rechts im Bild die Submukosa.



### 2.4.3 Die Präparation isolierter Krypten

Für die Isolation der Krypten wurden Ratten mit einem Gewicht von bis zu 190 g verwendet, da hier die Ausbeute an intakten Krypten am höchsten ist (Schultheiss et al. 2002). Die Krypten wurden lediglich aus dem distalen Bereich des Kolons isoliert. Ausgangsmaterial war ein Mukosa-Submukosa-Präparat (siehe Kap. 2.4.1), wovon ein etwa 3 cm breites Stück mittels Cyanacrylatkleber auf einem mit einer ovalen Aussparung versehenen Plexiglashalter fixiert wurde (Schultheiss et al. 2002). Je nach Gewicht und Alter der Tiere wurde das Gewebe nun für 6 - 8 Minuten in einer  $\text{Ca}^{2+}$ -freien EDTA-haltigen Isolationslösung (siehe Kap. 2.2.1.1) bei 40 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der Plexiglashalter in einen Vibromischer (Chemap, Volketswil, Schweiz) gespannt. Durch die Vibration wurden die Krypten (Abb. 2.2) in ein Gefäß mit Auffangtyrode (siehe Kap. 2.2.1.2) geschüttelt. Die isolierten Krypten wurden für  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Versuche und als Ausgangsmaterial für die RNA-Isolation benötigt. Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Versuche wurden 30  $\mu\text{l}$  der Kryptensuspension unter optischer Kontrolle entnommen und auf runde, mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen aufgebracht und die Suspension mit Auffangtyrode auf 100  $\mu\text{l}$  aufgefüllt.



**Abb. 2.2: Einzelne Krypte, isoliert aus dem distalen Kolon einer Ratte**  
(Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von M. Diener)

### **2.5 Zellkultur der HT29/B6 Zellen**

Für einen Teil der Versuche wurde die HT29/B6 Zelllinie benötigt. Diese wurden mir freundlicherweise von Prof. Dr. M. Fromm, Institut für Klinische Physiologie, Charité Berlin zur Verfügung gestellt. Bei den HT29/B6 Zellen handelt es sich um eine polare, adhärent wachsende humane Kolonkarzinomzelllinie (Kreusel et al. 1991).

#### **2.5.1 Kulturbedingungen**

Für die Kultur der HT29/B6 Zellen wurde als Standardmedium RPMI 1640 mit 10 % FBS Gold und L-Glutamin (PAA, Cölbe, Deutschland) verwendet. Diesem wurde 1 % (Vol/Vol) einer Antibiotika-Stammlösung aus Penicillin (10.000 U/ml) und Streptomycin (10 g/ml) (PAA, Cölbe, Deutschland) zugesetzt. Die Kultur der Zellen erfolgte im CO<sub>2</sub>-Inkubator (TECO10, MS-L GmbH, Dielheim, Deutschland) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> (Vol/Vol) bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

Die Handhabung der Zellen erfolgte unter einer Sterilbank (LaminAir LB-48-C, Hereaus, Hanau, Deutschland) mit sterilen Lösungen und sterilem Arbeitsmaterial. Alle Medien und Lösungen wurden vor ihrer Verwendung stets auf 37 °C erwärmt.

#### **2.5.2 Auftauen der Zellen**

Die Zellen wurden im Kryoröhrchen schonend bei Raumtemperatur aufgetaut. Danach wurden die Zellen mit Einfriermedium in ein Falcon-Tube mit 10 ml Standardmedium überführt und für 5 min bei 1000 U/min abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 8 ml Medium durch Schütteln resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf zwei Zellkulturschalen (6 cm Durchmesser) aufgeteilt (jeweils 4 ml). Das Volumen jeder Zellkulturschale wurde mit Medium auf 6 ml aufgefüllt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Inkubator unter den oben genannten Bedingungen (siehe Kap. 2.5.1). Alle zwei Tage wurde das Zellkulturmedium gewechselt.

### 2.5.3 Passagieren der Zellen

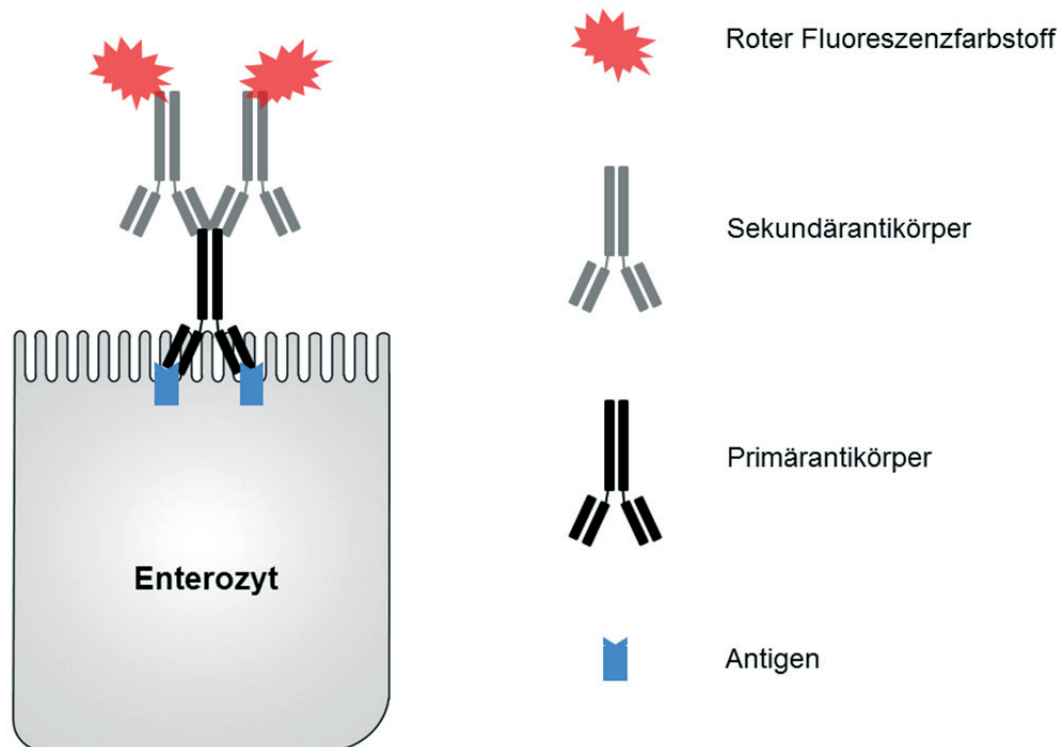
Einmal pro Woche mussten die Zellen passagiert werden, da diese dann nahezu konfluent waren. Das Kulturmedium wurde abgesaugt, der Zellrasen dreimal mit je 3 ml HBSS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  (PAA, Cölbe, Deutschland) gespült und anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,5 mg/ml Trypsin, 0,02 mg/ml EDTA; PAA, Cölbe, Deutschland) für 5 min bei 37 °C inkubiert. Durch vorsichtiges Klopfen an den Boden der Zellkulturschale konnten die Zellen gelöst werden. Nach dem Ablösen der Zellen wurde die Trypsinierung durch Zugabe von 1 ml Zellkulturmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein Falcontube überführt. Die Zellsuspension wurde gründlich mithilfe eines Vortex-Mischers geschüttelt um die Zellen zu vereinzeln und anschließend für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit 6 - 10 ml Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl wurde mikroskopisch mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wurden  $10^5$  Zellen in neuen Zellkulturschalen eingesetzt.

Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Experimente wurden entfettete Deckgläschen von 1,3 cm Durchmesser in 4-Well Platten verbracht und darauf die Zellen ausgesät (Dichte ca. 10000 Zellen pro Deckgläschen). Jedes Well wurde mit 500  $\mu\text{l}$  Kulturmedium aufgefüllt und unter den oben genannten Bedingungen inkubiert. Die Imaging-Experimente wurden durchgeführt, wenn die Zellen präkonfluent waren und kleine Zellinseln gebildet hatten (i.d.R. nach 2 Tagen).

## 2.6 Immunfluoreszenz-Analyse

### 2.6.1 Grundlagen der Immunfluoreszenz

Mit dieser Methode können Proteine über Antigen-Antikörper Reaktionen direkt am Gewebeschnitt nachgewiesen werden. Voraussetzungen sind das Vorhandensein von antigenen Strukturen auf den zu untersuchenden Geweben und die Verfügbarkeit von spezifischen Antikörpern, die an das gesuchte Antigen binden können. Für den lichtmikroskopischen Nachweis der entstehenden Antigen-Antikörper-Komplexe wurde für die vorliegende Arbeit die indirekte Immunfluoreszenz verwendet. Hierfür wird zusätzlich zu dem antigenspezifischen Primärantikörper ein sekundärer Antikörper eingesetzt. An diesen Sekundärantikörper, der mit seiner Fab-Region gegen die Fc-Region des Primärantikörpers gerichtet ist, ist ein Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) gekoppelt. Wird dieses Fluorophor mit energiereichem, kurzwelligem Licht angeregt, emittiert es langwelliges Licht und dient somit der Detektion des Komplexes, bestehend aus Antigen, Primär- und Sekundärantikörper (Abb. 2.3).



**Abb. 2.3: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung**

Der primäre Antikörper bindet mit seinen Fab-Fragmenten an die Epitope des Antigens. An das Fc-Fragment des primären Antikörpers wiederum bindet der mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Sekundärantikörper. Dieser Komplex kann dann mittels Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

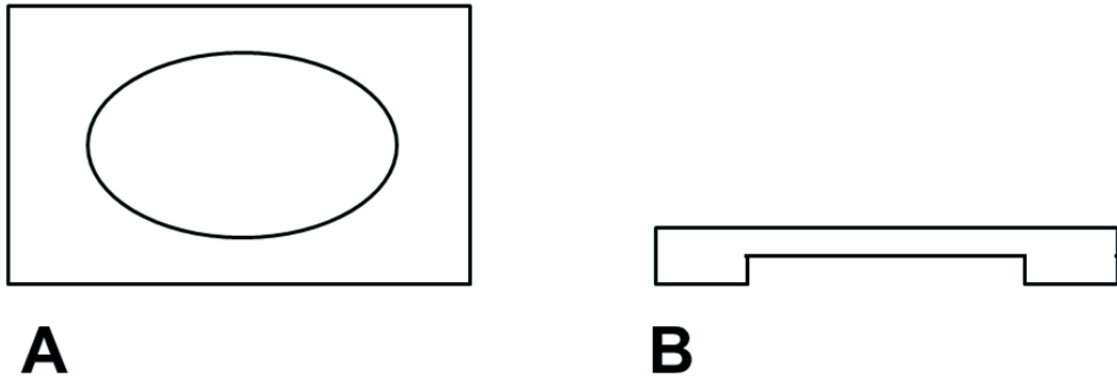
### **2.6.2 Immunfluoreszenzmarkierung an Gewebeschnitten**

#### **2.6.2.1 Gelatinebeschichtung der Objektträger**

Zunächst wurden die Objektträger über Nacht in Wasser mit etwas Spülmittel platziert. Am nächsten Tag wurden die Objektträger unter klarem Wasser abgespült und für eine Stunde in Aqua dest. gestellt. Anschließend wurden diese für 15 Minuten in Aceton gestellt und danach an der Luft getrocknet. Die trockenen Objektträger wurden dann 10 Minuten lang in die vorbereitete Gelatinelösung (siehe Kap. 2.2.3.1) gestellt und anschließend über Nacht bei 60 °C im Trockenschrank getrocknet.

#### **2.6.2.2 Fixierung und Gelatine-Einbettung des Gewebes**

Das Kolon wurde wie unter Kapitel 2.4.1 beschrieben vorbereitet, allerdings wurden die Tunica muscularis und die Tunica serosa nicht abpräpariert. Davon wurde jeweils ein etwa 3 cm langes Stück Gewebe mittels Cyanacrylatkleber auf einem Plexiglashalter (Abb. 2.4) fixiert. Anschließend wurden die Halter mit dem Gewebe in 4 %-ige (Gew/Vol) Paraformaldehydlösung (siehe Kap. 2.2.3.4) gelegt und für 12 h bei + 4 °C fixiert. Danach folgten drei Waschschrte für jeweils eine Stunde in Phosphatpuffer (siehe Kap. 2.2.3.3). Die Halter wurden dann horizontal in die flüssige Gelatinelösung (siehe Kap. 2.2.3.2) gelegt. Da die Halter kleine Füßchen hatten, wurde das Gewebe sowohl von oben als auch von unten mit Gelatine bedeckt. Damit sich das Gewebe und die Gelatine fest miteinander verbinden konnten, wurde dieses randständig entlang der ovalen Aussparung mittels einer Kanüle perforiert. Nach dem Erstarren der Gelatine wurden etwa 1 cm x 1 cm große Gewebe-Gelatine-Blöcke mit einem spitzen Skalpell aus der Aussparung des Halters herauspräpariert. Mittels dem Gefriereinbettmedium Tissue Tec® (Leica Instruments, Nussloch, Deutschland) wurden diese Blöcke auf Kork befestigt und für zwei Minuten in stickstoffgekühltes Isopentan (Temperatur -160 °C) eingetaucht. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Blöcke bei -80 °C aufbewahrt.



**Abb. 2.4: Schematische Skizze eines Plexigashalters für die Gewebefixierung und –einbettung**

A: Draufsicht; B: Seitenansicht

### 2.6.2.3 Herstellung der Gewebeschnitte

Die Gewebeschnitte des distalen Kolons wurden an einem Kryostat der Firma Leica (Leica CM 3050S) angefertigt. Die gefrorenen Gewebelöcke wurden mit Tissue Tec<sup>®</sup> auf dem beweglichen Objekthalter fixiert und bei einer Kühlkammertemperatur von -19 °C und einer Objekthaltertemperatur von -17 °C Gewebeschnitte von 1 - 6 µm Schnittdicke angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden auf mit Gelatine beschichtete Objektträger übertragen und in der Kühlkammer des Mikrotoms bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

### 2.6.2.4 Verwendete Antikörper

**Tab. 2.1: Verwendete Primärantikörper**

<b>Primär-antikörper</b>	<b>Antigen</b>	<b>Wirt</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Anti-CHT1</b>	hochaffiner Cholintransporter	Kaninchen	1:50	Millipore (AB5966)
<b>Anti-ChAT</b>	Cholin-acetyltransferase	Kaninchen	1:1000	M. Schemann (Schemann et al. 1993)
<b>Anti-CarAT</b>	Carnitin-acetyltransferase	Kaninchen	1:100	Abcam (ab153699)
<b>Anti-VACHT</b>	Vesikulärer Acetylcholintransporter	Kaninchen	1:800	E. Weihe (Weihe et al. 1996)
<b>Anti-OCT1</b>	Organischer Kationentransporter 1	Kaninchen	1:50	Santa Cruz (sc-232)
<b>Anti-OCT2</b>	Organischer Kationentransporter 2	Kaninchen	1:50	Santa Cruz (sc-233)
<b>Anti-OCT3</b>	Organischer Kationentransporter 3	Kaninchen	1:50	Santa Cruz (sc-9081)

**Tab. 2.2: Verwendeter Sekundärantikörper**

<b>Sekundär-antikörper</b>	<b>Zielstruktur</b>	<b>Darstellung</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Cy3-donkey anti-rabbit IgG	Primärantikörper aus dem Kaninchen	rot	1:800	Dianova

### 2.6.2.5 Färbeprotokoll

**Tab. 2.3: Färbeprotokoll für die Immunfluoreszenzmarkierung.**

Die Zusammensetzungen der Lösungen sind unter Kapitel 2.2.3 beschrieben.

	Arbeitsschritt	Reagenz	Temperatur	Zeit
1	Rehydrierung	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
2	Blockierung unspezifischer Bindungsstellen	Blocking-Lösung	Raumtemperatur	2 h
3	Inkubation mit Primärantikörper	Primärantikörper-Lösung	4 °C	24 h
4	Waschen	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
5	Inkubation mit Sekundärantikörper (unter Lichtschutz)	Sekundärantikörper-Lösung	Raumtemperatur	1 h
6	Waschen (unter Lichtschutz)	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	3 x 5 min
7	Kernfärbung (unter Lichtschutz)	DAPI-Lösung	Raumtemperatur	5 min
8	Waschen (unter Lichtschutz)	Phosphatpuffer	Raumtemperatur	4 x 5 min
9	Eindeckeln (unter Lichtschutz)	Hydromount®	Raumtemperatur	

Zunächst wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten in Objektträgerhalter einsortiert und diese in verschließbare, mit ca. 200 ml Phosphatpuffer gefüllte Färbeküvetten überführt. Diese wurden für 3 x 5 Minuten auf einen Schüttler (Polymax 1040, Heidolph, Schwabach, Deutschland) gestellt und die Gewebeschnitte auf diese Weise rehydriert. Dabei wurde jeweils nach 5 Minuten der Puffer durch frischen ersetzt. Im Anschluss wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch zweistündige Inkubation in Blocking-Lösung (siehe Kap. 2.2.3.5) bei Raumtemperatur abgesättigt. Dazu wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten nach unten



weisend auf Inkubationsplatten aus Polycarbonat (institutseigene Herstellung) ausgelegt. Die Auflagefläche für die Objektträger auf den Inkubationsplatten war durch Klebeband geringfügig erhöht, so dass sich zwischen den Polycarbonatplatten und den Gewebeschnitten ein kapillarer Spalt befand. Es wurden 200 µl der Blocking-Lösung pro Objektträger an dessen Rand pipettiert, woraufhin sich die Lösung durch die Kapillarkräfte in den Spalt zog. Während der Inkubationszeit wurden die Inkubationsplatten in einer geschlossenen, befeuchteten Metallkammer aufbewahrt, um eine Austrocknung zu verhindern. Im nächsten Schritt wurde mit derselben Technik eine 24-stündige Inkubation der Gewebeschnitte mit dem Primärantikörper bei +4 °C durchgeführt. Die entsprechenden Konzentrationen der Primärantikörper sind der Tabelle 2.1 zu entnehmen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Objektträger wiederum für 3 x 5 Minuten in Phosphatpuffer gewaschen, um die überschüssigen, ungebundenen Primärantikörper von den Gewebeschnitten zu entfernen. Nach jeweils 5 Minuten wurde der Phosphatpuffer erneuert. Im Anschluss erfolgte die Markierung der Primärantikörper mittels Cy3-konjugiertem Sekundärantikörper (siehe Tab. 2.2). Die Inkubation mit der Sekundärantikörperlösung erfolgte wie zuvor auf den Inkubationsplatten und in der feuchten Kammer für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtschutz. Da die Fluoreszenzfarbstoffe, die an den Sekundärantikörper gekoppelt sind, sehr lichtempfindlich sind und schnell ausbleichen wurden auch alle folgenden Schritte unter Lichtschutz durchgeführt. Es folgten wieder Waschschrte (3 x 5 min) in Phosphatpuffer. Für eine bessere Orientierung im Gewebe wurde eine Färbung der Zellkerne mit einer 300 nmol/l DAPI-Lösung (siehe 2.2.3.8) durchgeführt. Dieser Farbstoff interkaliert vornehmlich in AT-(Adenin und Thymin)-reiche Sequenzen der DNA-Doppelhelix und lässt sich nach Anregung mit UV-Licht als cyanblauer Farbstoff in den Zellkernen nachweisen (Tanious et al. 1992). Im Anschluss folgten vier fünfminütige Waschschrte in Phosphatpufferlösung. Zum Schluss folgte das sog. Eindeckeln der Schnitte. Dazu wurde auf jeden einzelnen Schnitt jeweils ein Tropfen Hydromount® (National Diagnostics, Atlanta, GA, USA) vorgelegt und darauf vorsichtig und luftblasenfrei ein Deckgläschen aufgelegt, welches mit klarem Nagellack fixiert wurde. Nach dem Trocknen des Nagellacks wurden die Präparate innerhalb der nächsten 12 Stunden

ausgewertet. Tabelle 2.3 zeigt an ein exemplarisches Protokoll einer Einfachmarkierung mit anschließender DAPI-Kernfärbung.

### **2.6.2.6 Negativkontrollen**

Um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers auszuschließen, wurde zu jeder Fluoreszenzmarkierung eine Negativkontrolle mitgeführt. Zu diesem Zweck wurden Gewebeschnitte mit der Primärantikörperlösung inkubiert, jedoch ohne den Zusatz des Primärantikörpers. Das Auftreten von Fluoreszenzsignalen in der Negativkontrolle hätte dabei auf unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers hingewiesen. In einem solchen Fall hätte die entsprechende Versuchsreihe nicht ausgewertet werden dürfen, da die erhaltenen Fluoreszenzsignale nicht spezifisch für das gesuchte Antigen gewesen wären.

### **2.6.2.7 Mikroskopie**

Die Analyse der Gewebeschnitte erfolgte an einem Nikon Eclipse 80i Mikroskop (Nikon, Düsseldorf, Deutschland). Das Mikroskop verfügte über spezielle Filter, die nur Licht bestimmter, für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs benötigter, Wellenlängen passieren ließ. Die Cy3-konjugierten Sekundärantikörper wurden mit einer Wellenlänge von 510 – 530 nm angeregt, woraufhin diese Licht mit einer Wellenlänge von 630 – 660 nm emittierten. Der Kernfarbstoff DAPI wurde mit Licht der Wellenlänge 358 nm angeregt und emittierte Licht der Wellenlänge 461 nm. Die Bilddokumentation erfolgte über eine digitale Schwarz/Weiß-Kamera (S/W camera Digital Slight DS 2 M BWc; Nikon). Mit Hilfe des Software-Programms NIS-Elements 2.30 (Nikon) wurden die Schwarzweißbilder entsprechend der emittierten Lichtfarbe eingefärbt. So werden Cy3-Signale rot und DAPI-Kernsignale blau dargestellt. Das Fotografieren der betreffenden Gewebeausschnitte mit den entsprechenden Filtern und anschließender Überlagerung der Farbkanäle erleichterte die Lokalisation der Cy3-Signale. Die Bilder wurden in dem Programm Adobe Photoshop CS2 weiterbearbeitet, um gegebenenfalls den Kontrast zu erhöhen und Bildtafeln zu erstellen.

## 2.7 Enzymhistochemischer Nachweis der Esteraseaktivität

Mithilfe der Thiocholinmethode nach Karnovsky und Roots (1964) kann die Acetylcholinesterase-Aktivität dargestellt werden. Die Anfärbung findet durch eine chemische Umsetzung statt, die nach folgendem Prinzip abläuft (siehe Abb. 2.5): Die Acetylcholinesterase spaltet Acetylthiocholin hydrolytisch in Acetat und Thiocholin. Die Sulfhydrylgruppe des Thiocholins reduziert das Eisen in Ferricyanid-Ionen ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ ) aus der dreiwertigen Form ( $\text{Fe}^{3+}$ ) in die zweiwertige Form ( $\text{Fe}^{2+}$ ), sodass Ferrocyanid-Ionen ( $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ) entstehen. Die Ferrocyanid-Ionen bilden mit den in der Inkubationslösung vorhandenen  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen einen unlöslichen Kupferferrocyanid-Komplex, der als brauner Niederschlag (*Hatchett's brown*) eine positive Reaktion anzeigt.

Es wurde ein modifiziertes Inkubationsmedium (Tsuji und Larabi 1983) für den Esterasenachweis verwendet, da sich dieses als stabiler gegenüber dem Originalmedium nach Karnovsky und Roots erwies.

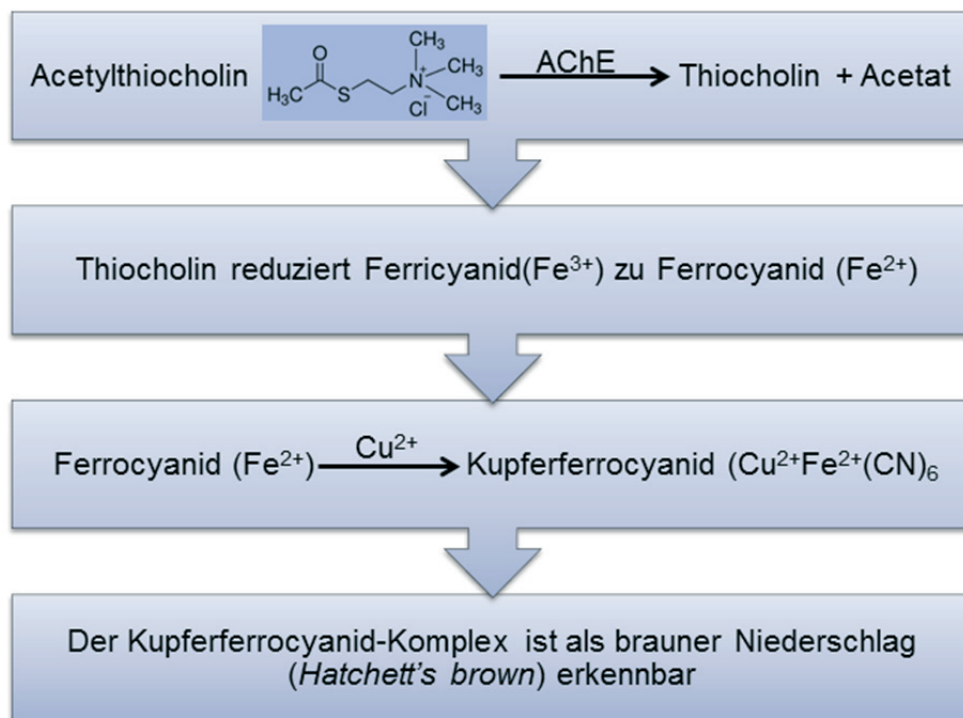


Abb. 2.5: Mechanismus der Karnovsky-Reaktion

Für den Esterasenachweis wurde in PFA fixiertes distales Kolon der Ratte verwendet (zu Fixierung und Gelatine-Einbettung des Gewebes siehe Kap. 2.6.2.2). Zunächst wurden Gewebeschnitte, wie bereits in Kapitel 2.6.2.3 beschrieben, mit einer Schnittdicke von 4 - 6  $\mu\text{m}$  angefertigt und auf Gelatine-beschichtete Objektträger (siehe Kapitel 2.6.2.1) aufgebracht. Anschließend wurden die Gewebeschnitte 3 x 5 min in Maleatpuffer (siehe Kap. 2.2.5.1) rehydriert und danach in eine mit der Inkubationslösung (siehe Kap. 2.2.5.3) gefüllte Standkuvette überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Schließlich wurden die Präparate für 8 min in Maleatpuffer gewaschen (dabei wurde der Puffer alle 2 min durch frischen ersetzt) und anschließend mit Hydromount<sup>®</sup> eingedeckelt. Um eine unspezifische Reaktion auszuschließen, wurde das Gewebe in einer Lösung inkubiert, die genauso zusammengesetzt war wie in Kapitel 2.2.5.3 beschrieben mit dem einzigen Unterschied, dass kein Acetylthiocholinchlorid zugesetzt wurde.

Die Analyse der Gewebeschnitte erfolgte an einem Nikon Eclipse 80i Mikroskop (Nikon, Düsseldorf, Deutschland). Die Bilddokumentation erfolgte über eine digitale Farbkamera (DS-2Mv, Nikon). Die Bilder wurden in dem Programm Adobe Photoshop CS2 weiterbearbeitet, um gegebenenfalls den Kontrast zu erhöhen und Bildtafeln zu erstellen.

### 2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

#### 2.8.1 Prinzip der PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR = Polymerase chain reaction) ist eine weitverbreitete in-vitro Technik, die 1983 von Kary B. Mullis entwickelt wurde (siehe [www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org)). Dabei wird ein, von zwei spezifischen Oligonukleotiden (Primer) flankiertes DNA-Fragment in einer zyklischen Reaktion mehrfach vervielfältigt.

Die PCR besteht aus folgenden Schritten (siehe Abb.2.6):

1. *Denaturierung*
2. *Annealing*
3. *Elongation*

Zunächst wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 92 - 95 °C aufgetrennt (Denaturierung). Die dabei entstehenden Einzelstränge dienen als Matrize für die weitere Vervielfältigung. Anschließend wird die Temperatur abgesenkt, in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer. Dabei kommt es zur Hybridisierung (Annealing) der Primer an die komplementären Sequenzen der Matrizen-DNA. Im nächsten Schritt, der Elongation, werden die Primer bei 72 °C von einer hitzestabilen DNA-Polymerase in Anwesenheit freier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und  $Mg^{2+}$ -Ionen komplementär zur Matrizen-DNA verlängert, sodass am Ende alle DNA-Moleküle wieder doppelsträngig vorliegen. Diese drei Schritte werden etwa 30 - 40 mal wiederholt, wobei die bei einem Zyklus entstehenden Amplifikate im nächsten Zyklus wieder als Matrize dienen. Die Primer sind kurze DNA-Fragmente mit einer Größe von etwa 20 Nukleotiden. Für eine spezifische Amplifikation müssen diese komplementär zu den DNA-Sequenzen sein, die das gesuchte Ziel-Gen flankieren.

Damit die Reaktion überhaupt ablaufen kann, muss die verwendete DNA-Polymerase hitzestabil sein. Für die vorliegende Arbeit wurde die Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* eingesetzt. Diese besitzt eine hohe Enzymaktivität und eine Temperaturstabilität bis 95 °C und ist somit in der Lage, den Denaturierungsschritt zu überstehen.

Für die vorliegende Arbeit wurde eine sogenannte Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt. Hierbei wird mithilfe der reversen Transkriptase (RT) zunächst RNA in eine komplementäre DNA (cDNA) transkribiert und diese dann anschließend mittels PCR vervielfältigt (Abb. 2.6).

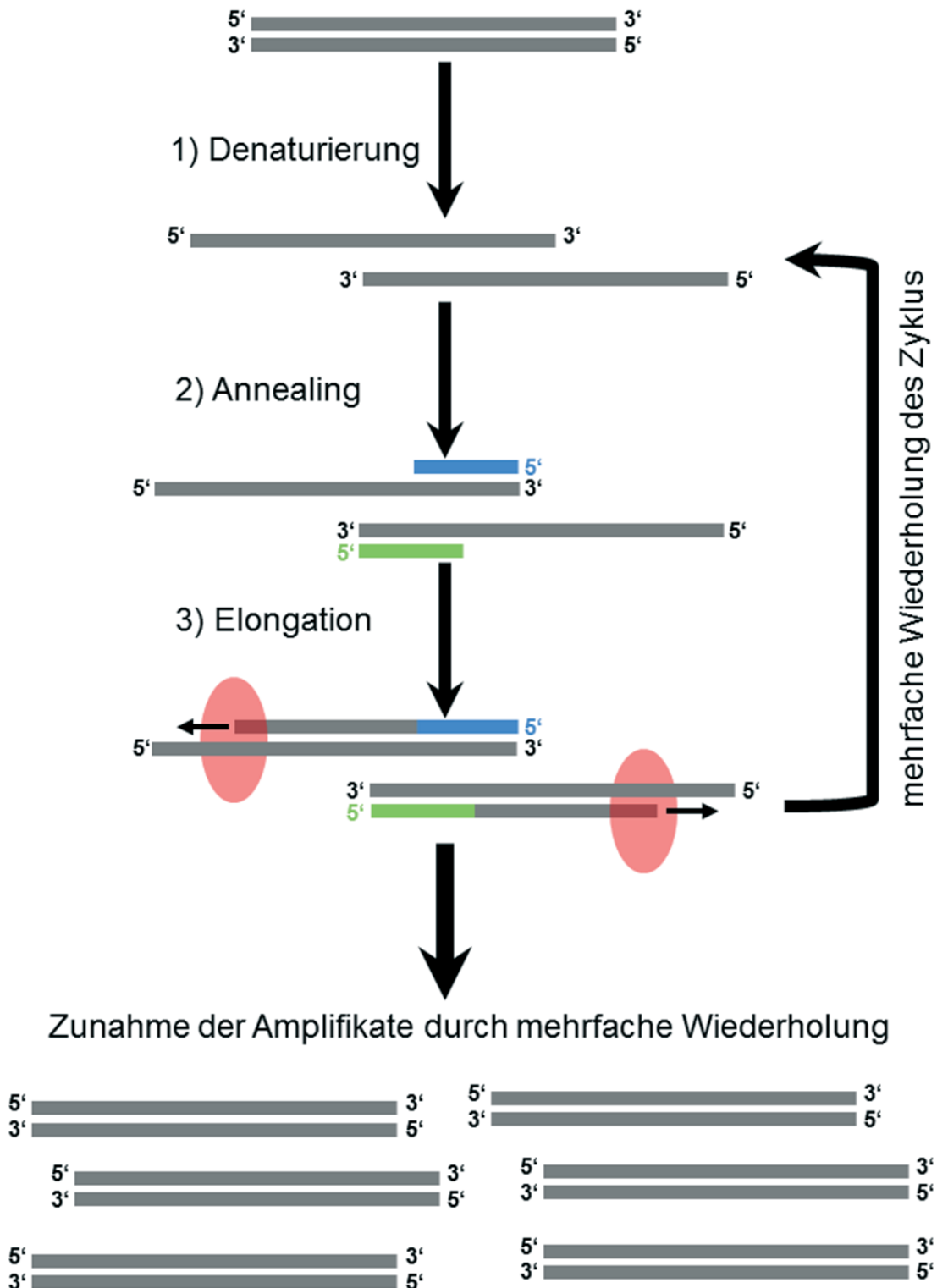


Abb. 2.6: Ablauf einer typischen PCR-Reaktion

### **2.8.2 RNA-Isolation aus Krypten des distalen Kolons**

Als Ausgangsmaterial für die RNA-Isolation aus Epithelzellen des Kolons wurden Krypten des distalen Kolons benötigt. Diese wurden wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben isoliert und in Auffangtyrode gesammelt. Durch Zentrifugation (3 min bei 1000 U/min) bildete sich ein Kriptenpellet am Boden des Gefäßes. Der Überstand wurde verworfen und mit dem Pellet die Isolation der Gesamt-RNA mit anschließendem DNase-Verdau mithilfe des NucleoSpin® RNA Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Menge der gewonnenen Gesamt-RNA wurde mithilfe des BioPhotometers plus (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

### **2.8.3 RNA-Isolation aus der Kolonmukosa**

Für den Nachweis der Cholinacetyltransferase-mRNA wurde Gesamt-RNA aus der Kolonmukosa benötigt, da diese nicht in Kripten-RNA zu detektieren war. Die hierfür benötigte Mukosa des distalen Kolons wurde wie unter Kapitel 2.4.2 beschrieben präpariert. Etwa 1 cm lange Stücke der Mukosa wurden unmittelbar nach der Präparation und bis zur weiteren Verarbeitung in RNAlater (Qiagen, Hilden, Deutschland) gelagert. RNAlater dient der Stabilisierung der im Gewebe enthaltenen RNA und der Inhibition von RNasen (Florell et al. 2001). Zur RNA-Isolation wurde ein kleines Stück der Mukosa (20 - 30 mg) in ein Eppendorfgefäß (2 ml Volumen) überführt und für einige Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht. Daraufhin wurde in das Eppendorfgefäß eine Mahlkugel von 5 mm Durchmesser gegeben und die Mukosa in der Schwingmühle (MM301, Retsch, Haan, Deutschland) für 2 min bei 30 Hz homogenisiert. Daraus wurde mittels NucleoSpin® RNA Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) die Gesamt-RNA gewonnen und der DNase-Verdau durchgeführt. Die Menge der gewonnenen Gesamt-RNA wurde mithilfe des BioPhotometers plus (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.

### **2.8.4 RNA-Isolation aus Referenzgewebe**

Zur Isolation der RNA wurden Proben des Referenzgewebes (Rückenmark, Herzmuskel, Skelettmuskel, Leber, Lunge), in denen die Expression des jeweiligen Ziel-Gens bereits in der Literatur beschrieben worden war, unmittelbar nach dem Töten des Tieres entnommen und sofort in RNAlater (Qiagen, Hilden, Deutschland) gegeben und darin bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Zur RNA-Isolation wurden jeweils 20 - 30 mg der Kontrollgewebe in ein Eppendorfgefäß (Größe: 2 ml) überführt und für einige Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht. Daraufhin wurde in das Eppendorfgefäß eine Mahlkugel von 5 mm Durchmesser (Retsch, Haan, Deutschland) gegeben und das Gewebe in einer Schwingmühle (MM301, Retsch, Haan, Deutschland) für 2 min bei 30 Hz homogenisiert. Daraus wurde mittels NucleoSpin<sup>®</sup>-RNA Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) die Gesamt-RNA gewonnen und der DNase-Verdau durchgeführt. Die Menge der gewonnenen Gesamt-RNA wurde mithilfe des BioPhotometers plus (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die RNA bei -80 °C gelagert.



### 2.8.5 Reverse Transkription

Um die RNA in cDNA (komplementäre DNA) umzuschreiben, wurde eine reverse Transkription mit dem Tetro cDNA Synthesis Kit (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) oder mit dem Superscript II cDNA Synthesis Kit (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Bei cDNA Synthese mit dem Tetro cDNA Kit wurde je Probe der Primermix wie in Tabelle 2.4 beschrieben angesetzt und gründlich mittels Pipette durchmischt.

**Tab. 2.4: Zusammensetzung des Primermixes für die cDNA-Synthese mit dem Tetro cDNA Synthesis Kit**

Primermix	Volumen
Gesamt-RNA	6 µl
Random Hexamer Primer	1 µl
dNTPs (10 mmol/l)	1 µl
5 x RT-Puffer	4 µl
Ribosafe RNase Inhibitor	1 µl
Tetro Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl
RNase freies Wasser	6 µl
<b>Summe</b>	<b>20 µl</b>

Anschließend folgte eine Inkubation im Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf) mit folgendem Programm:

- 1) 10 min bei 25 °C
- 2) 60 min bei 45 °C
- 3) 5 min bei 85 °C

Nach Beendigung des Programms wurden die Proben sofort auf Eis gelagert und mit 80 µl RNase-freiem Wasser aufgefüllt.

Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -80 °C gelagert.

Bei cDNA Synthese mit dem Superscript II cDNA Kit wurde je Probe zunächst folgender Primermix angesetzt (Tab. 2.5) und gründlich mittels Pipette durchmischt:

**Tab. 2.5: Zusammensetzung des Primermixes für die cDNA-Synthese mit dem Superscript II cDNA Synthesis Kit**

Primermix	Volumen
Gesamt-RNA 5 µg	x µl
Random Hexamer Primer	1 µl
dNTPs (10 mmol/l)	1 µl
RNase freies Wasser	ad 12 µl
<b>Summe</b>	<b>12 µl</b>

Der Primermix wurde bei 65 °C für 5 min inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nun wurde die Mischung kurz zentrifugiert, 4 µl von 5X First-Strand Buffer und 2 µl von 0,1 M DTT hinzu pipettiert, gründlich durchmischt und bei 25 °C für 2 min inkubiert. Danach wurde 1 µl von der SuperScript™ II Reversen Transkriptase zugeben und gründlich gemischt.

Anschließend folgte eine Inkubation im Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf) mit folgendem Programm:

- 1) 10 min bei 25 °C
- 2) 50 min bei 42 °C
- 3) 15 min bei 70 °C

Nach Beendigung des Programmes wurden die Proben sofort auf Eis gelagert und mit 80 µl RNase-freiem Wasser aufgefüllt.

Bis zur weiteren Verwendung wurde die cDNA bei -80 °C gelagert.

### 2.8.6 Verwendete Primer

Die Oligonukleotidsequenzen wurden aus verfügbaren Publikationen (Tab. 2.6 und Tab. 2.7) ausgesucht und die Auswahl der passenden Primer durch das Programm Oligo 6.0 (Medprobe, Oslo, Norwegen) unterstützt, u. a. durch die Berechnung der Primer-Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>-Wert) und des GC-(Guanin-Cytosin)-Gehaltes. Einige Primer wurden mithilfe von Oligo 6.0 selbst entwickelt. Die Spezifität der Primer wurde durch eine Abfrage bei der BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Datenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) überprüft. Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

**Tab. 2.6: Sequenz der verwendeten Primer für Enzyme und Transporter des cholinergen Systems und für das Housekeeping-Gen GAPDH**

Ziel-molekül		Primer	Produkt-größe (bp)	Genbank accession number	Quelle
<b>CHT1</b>	For Rev	CAAGACCAAGGAGGAAGCAG GCAAACATGGAACTTGCTGA	150	AB030947	Lips et al. (2003)
<b>ChAT</b>	For Rev	CAACCATCTTCTGGCACTGA TAGCAGGCTCAATAGCCATT	183	XM_224626	Schirmer et al. (2011)
<b>CarAT</b>	For Rev	CTGCCAAACTCATCGAGGGTG CGGTGGTTGGAGGTTAGGAT	352	BC083616.1	Eigenes Design
<b>VACHT</b>	For Rev	ATCCATCGCCTCATGCTAGACC AAACCATGCCCATCTCCCAC	148	NM_031663	Eigenes Design
<b>OCT1</b>	For Rev	TGGCCGTAAGCTCTGTCTCT TCAAGGTATAGCCGGACACC	151	X78855	Lips et al. (2007a)
<b>OCT2</b>	For Rev	GCCTCCTGATCCTGGCTG GGTGTCAAGTTCTGAAGAGAG	226	X98334	Lips et al. (2005b)
<b>OCT3</b>	For Rev	TTCGGCGTTGGCATCACG CTGTAAGTGTGATCTCTGAG	421	NM_019230	Lips et al. (2005b)
<b>GAPDH</b>	For Rev	ACGGGAAGCTCACTGGCATG CTACAGCAACAGGGTGGTGG	303	BC059110	Eigenes Design

**Tab. 2.7: Sequenzen der verwendeten Primer für die Untereinheiten der nikotinergen Acetylcholinrezeptoren (nAChR)**

Ziel-molekül		Primer	Größe (bp)	Genbank accession number	Quelle
$\alpha 1$	For Rev	AACTTCATGGAGAGCGGAGA CAGCTCCACAATGACGAGAA	285	NM_024485	Schirmer et al. (2011)
$\alpha 2$	For Rev	CTTCGGTGAAGGAAGACTGG GGAGCCAACATGAAGGACAT	154	L 10077	Lips et al. (2005a)
$\alpha 3$	For Rev	GCCAACCTCACAAGAAGCTC CCAGGATGAAAACCCAGAGA	208	NM_052805	Schirmer et al. (2011)
$\alpha 4$	For Rev	GACTTTGCAGTCACCCACCT CGGCTATGCATGCTCACTAA	197	M 15682	Lips et al. (2005a)
$\alpha 5$	For Rev	ACCCTACCAATTTGCAACCA GACCCAAAGACCCATTCTGA	146	J 05231	Lips et al. (2005a)
$\alpha 6$	For Rev	TGGTGTTAAGGACCCCAAAA GCTGCTGGCTTAACCTCTTG	142	L 08227	Lips et al. (2005a)
$\alpha 7$	For Rev	GGAGGCTGTACAAGGAGCTG ACCCTCCATAGGACCAGGAC	446	L 31619	Lips et al. (2005a)
$\alpha 10$	For Rev	TCTGACCTCACAACCCACAA TCCTGTCTCAGCCTCCATGT	168	AF 196344	Lips et al. (2005a)
$\beta 1$	For Rev	TCCTAAGCGTGGTGGTCCTC TGTGGTTCGGGTAGTTGGTC	151	NM_012528	Mikulski et al. (2010)
$\beta 2$	For Rev	AGCCTTCTTTGGCTGTGCTC GAGCCGTTAGTAGCTGGACGA	116	NM_019297	Mikulski et al. (2010)
$\beta 3$	For Rev	CACTCTGCGCTTGAAAGGAA GCGGACCCATTTCTGGTAAC	196	NM_133597	Mikulski et al. (2010)
$\beta 4$	For Rev	ATGAAGCGTCCCGGTCTTGAAGTC GGTCATCGCTCTCCAGATGCTGGG	300	NM_052806	Liu et al. (2004)

### 2.8.7 Durchführung der PCR

Die zuvor synthetisierte cDNA wurde mittels PCR auf die Existenz bekannter und für die einzelnen gesuchten Proteine spezifischer DNA-Abschnitte untersucht. Für die Durchführung der PCR wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

**Tab. 2.8: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes je Probe**

PCR-Reaktionsansatz	
cDNA	1,0 µl
Primer (Forward)	1,0 µl
Primer (Reverse)	1,0 µl
Mastermix (MangoMix™)	12,5 µl
RNase-freies Wasser	9,5 µl

Der eingesetzte Mastermix (MangoMix™) wurde von der Firma Bioline (Luckenwalde, Deutschland) bezogen.

Die Amplifikation wurde in einem Thermocycler (Mastercycler gradient, Eppendorf) mit den in den Tabellen 2.9, 2.10 und 2.11 aufgeführten PCR-Programmen durchgeführt.

**Tab. 2.9: Touchdown PCR Programm für OCT1,  $\alpha 7$ ,  $\beta 1$  und  $\beta 4$**

	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
Zyklus 1 - 10	Denaturierung	95 °C	45 s
	Annealing	71 °C	45 s
	Elongation	72 °C	45 s
Je Zyklus wird die Annealingtemperatur um 1 °C reduziert			
Zyklus 11 - 40	Denaturierung	95 °C	45 s
	Annealing	61 °C	45 s
	Elongation	72 °C	45 s
	Finale Elongation	72 °C	45 s
	Abkühlung	4 °C	15 min

**Tab. 2.10: Touchdown PCR Programm für: CarAT,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 10$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$**

	Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
<b>Zyklus 1 - 10</b>	Denaturierung	95 °C	45 s
	Annealing	67 °C	45 s
	Elongation	72 °C	45 s
Je Zyklus wird die Annealingtemperatur um 1 °C reduziert			
<b>Zyklus 11 - 40</b>	Denaturierung	95 °C	45 s
	Annealing	57 °C	45 s
	Elongation	72 °C	45 s
	Finale Elongation	72 °C	45 s
	Abkühlung	4 °C	15 min

**Tab. 2.11: Touchdown PCR Programm für: ChAT, OCT2, OCT3, VACHT, CHT1**

	Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
<b>Zyklus 1 - 10</b>	Denaturierung	95 °C	45 s
	Annealing	65 °C	45 s
	Elongation	72 °C	45 s
Je Zyklus wird die Annealingtemperatur um -1 °C reduziert			
<b>Zyklus 11 - 40</b>	Denaturierung	95 °C	45 s
	Annealing	55 °C	45 s
	Elongation	72 °C	45 s
	Finale Elongation	72 °C	45 s
	Abkühlung	4 °C	15 min

Es wurde eine sogenannte Touchdown-PCR (PCR(TD)) durchgeführt (Tab. 2.9, 2.10, 2.11). Dabei ist das Standard PCR-Programm dahingehend abgewandelt, dass bei den ersten 10 bis 15 Zyklen die Annealingtemperatur schrittweise um 0,5 °C - 1 °C gesenkt wird. Bei den sich anschließenden Zyklen bleibt die Annealingtemperatur dann konstant. Ziel der PCR(TD) ist eine erhöhte Spezifität der PCR-Reaktion (Korbie und Mattick 2008).

### 2.8.8 Kontrollreaktionen

Für die Kontrolle der RNA-Extraktion, der cDNA-Synthese und des Erfolgs der Amplifikation wurden interne Kontrollen mitgeführt. Zu diesem Zweck wurde bei jedem Versuchsansatz eine PCR-Reaktion mit einem Primerpaar für GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) mitgeführt. Bei GAPDH handelt es sich um ein sogenanntes Housekeeping Gen. Darunter versteht man konstitutiv, von jedem Zelltyp exprimierte Gene. Als Positivkontrolle der Primer wurde anstelle der cDNA aus isolierten Krypten bzw. der Kolonmukosa cDNA aus Kontrollgewebe bei der PCR-Reaktion eingesetzt. Als Negativkontrollen für die Verunreinigung des verwendeten RNase-freien Wassers mit genomischer DNA wurden PCR-Reaktionen mit RNase-freiem Wasser anstelle der cDNA durchgeführt. Als Negativkontrolle, ob die RNA schon mit genomischer DNA verunreinigt war, wurde eine PCR-Reaktion mit RNA anstelle der cDNA durchgeführt. Um auszuschließen, dass die Reagenzien des cDNA Synthese Kits verunreinigt sind, erfolgte eine RT-PCR mit RNase-freiem Wasser anstelle der RNA.

### 2.8.9 Gelelektrophorese

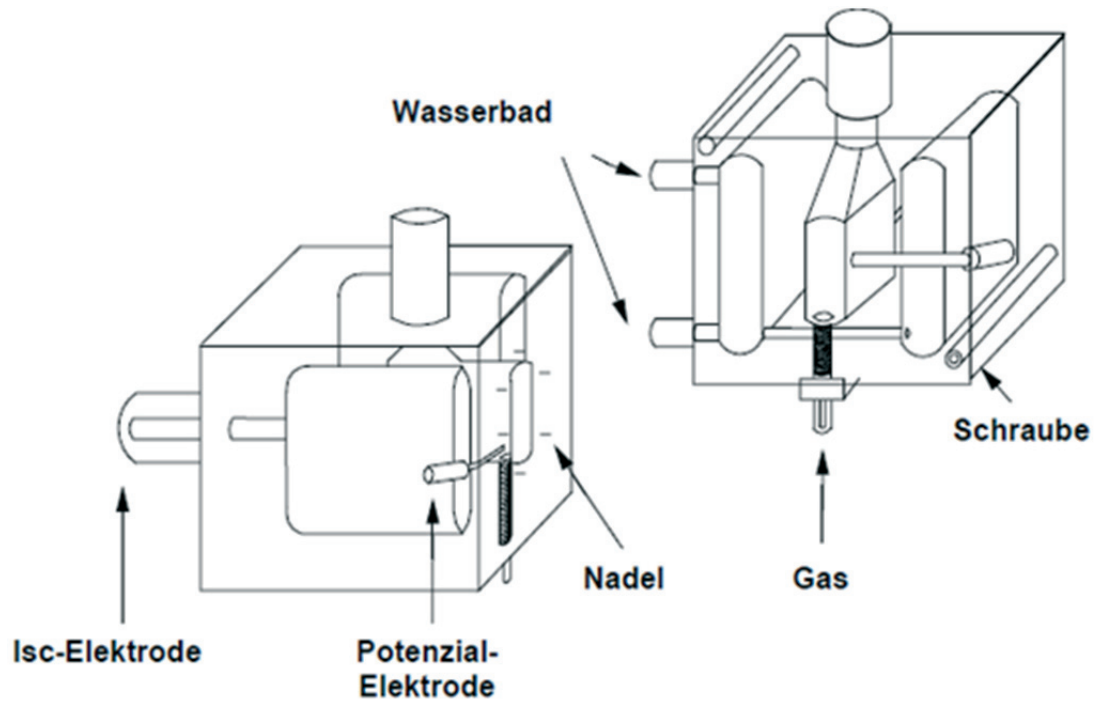
Zur optischen Darstellung der PCR-Produkte wurden jeweils 10 µl der Proben auf ein 2,5 – 3-%iges (Gew/Vol) Agarosegel [Standardagarose (Peqlab, Erlangen, Deutschland) in TAE-Puffer (Zusammensetzung in mmol/l: 40 Tris-Acetat, 1 EDTA, pH 8,15; MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)] aufgetragen. Um die Größe der Amplifikate bestimmen zu können wurden, zusätzlich 8 µl eines DNA-Markers aufgetragen (GeneRuler 50 bp DNA Ladder; Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland). Zur elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte und des Markers wurde an die Elektrophorese-Kammer für 2 Stunden eine Spannung von 50 V angelegt. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Durch einen speziellen Farbstoff (Roti®-GelStain; Roth, Karlsruhe, Deutschland oder GelRed™; Biotium, Hayward, CA, USA), der dem Agarosegel beigemischt wurde, konnten die Banden unter UV-Licht (Anregungswellenlänge 312 nm) sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert werden (BioCapt 11.03; Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland).

### 2.9 Ussingkammer-Messungen

#### 2.9.1 Die Messkammer

Die Ussingkammer-Technik wurde Anfang der 1950er Jahre von dem dänischen Physiologen Hans H. Ussing entwickelt (Ussing und Zerahn 1951). Mit dieser Technik ist es möglich, elektrogene Transportprozesse an Epithelien verschiedener Organe, wie zum Beispiel dem Kolonepithel, zu messen. Da die heutzutage verwendeten Messkammern im Detail nicht mehr den Originalentwürfen von Ussing entsprechen, spricht man auch von *modifizierten Ussingkammern*. Abbildung 2.7 zeigt eine schematische Darstellung einer Ussingkammer, wie sie für diese Studie verwendet wurden. Die Messkammern bestanden aus zwei Plexiglaskammerhälften, die durch Plexiglasschrauben miteinander verbunden waren. Zwischen beide Kammerhälften wurde ein Gewebestück an feinen Metallstiften aufgespannt. Dadurch entstanden zwei separate, durch das Gewebe getrennte Kompartimente. Das Volumen der Kompartimente betrug jeweils 3,5 ml. An der Oberseite der Kammer war für jede Seite eine Öffnung vorhanden, über welche die Pufferlösungen gewechselt oder die verschiedenen Substanzen appliziert werden konnten. Während der gesamten Versuchsdauer wurde das Gewebe von beiden Seiten von Pufferlösung umspült, welche durch den Anschluss an ein temperiertes Wasserbad konstant auf 37 °C gehalten werden konnte. Eine ständige Begasung über zwei Gasfritten am Boden der Kammern sorgte für eine ausreichende Versorgung des Kolongewebes mit Carbogen und für einen konstanten pH-Wert von 7,4. Unter diesen Bedingungen bleiben die epithelialen Funktionen bis zu sechs Stunden nach Organentnahme erhalten ohne morphologische Veränderungen aufzuweisen (Diener et al. 1989b). Für einen wasserdichten Verschluss wurde im Bereich der Kontaktflächen der beiden Kammerhälften ein dünner Silikonfilm aufgetragen.



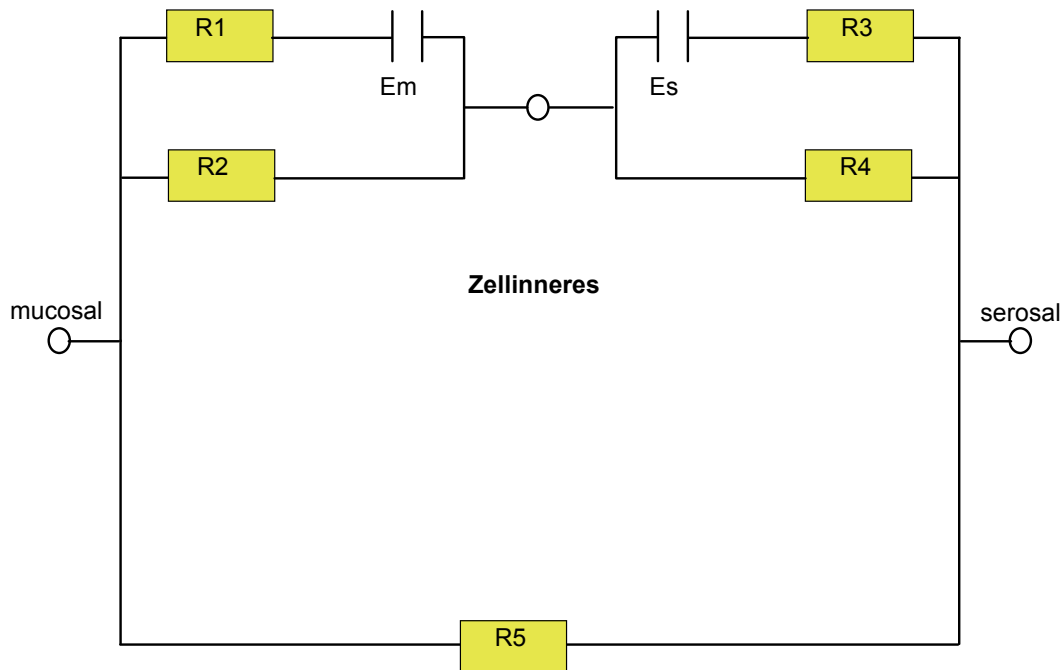


**Abb. 2.7: Schema einer modifizierten Ussingkammer**

(Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von M. Diener)

### 2.9.2 Theorie der Ussingkammer-Technik

Um mithilfe der Ussingkammer transepitheliale Potentialänderungen theoretisch zu beschreiben, entwickelten Ussing und Zerahn ein Ersatzschaltkreismodell (Abb. 2.8). In diesem System wird das eingespannte Gewebe als Widerstand bzw. Batterie betrachtet. Dabei sind die Widerstände der basolateralen und der apikalen Membran in Reihe geschaltet.



**Abb. 2.8: Ersatzschaltkreismodell von Ussing und Zerahn (1951) für ein Epithel**  
(Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von M. Diener)

R1 = Innenwiderstand der apikalen Stromquelle [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]

R2 = Widerstand der apikalen Membran [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]

R3 = Innenwiderstand der basolateralen Stromquelle [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]

R4 = Widerstand der basolateralen Membran [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]

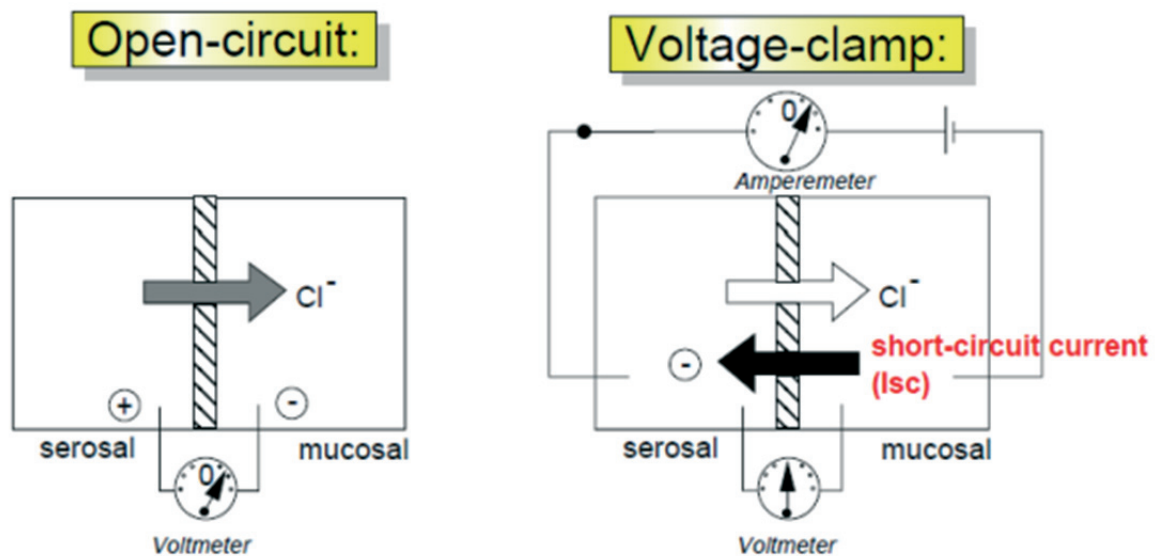
R5 = parazellulärer Widerstand [ $\Omega \cdot \text{cm}^2$ ]

Em = Potential an der apikalen Membran [mV]

Es = Potential an der basolateralen Membran [mV]

Ursprünglich erfolgte die Steuerung der Messanlagen über manuell regulierbare Batterien und Potentiometer. Heutzutage ist es möglich, das System vollständig mittels spezieller Software per Computer zu steuern und die elektrischen Parameter wie Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$  = short-circuit current), Gewebeleitfähigkeit ( $G_t$  = Kehrwert des Widerstandes;  $t$  = tissue) oder transepitheliale Potentialdifferenz (Pd) kontinuierlich zu erfassen. Für diese Studie wurde eine automatische Voltage-Clamp-Anlage zusammen mit der Software Winclamp (Dipl. Ing. K. Mussler Scientific Instruments, Aachen, Deutschland) verwendet.

Die Ussingkammern verfügten über zwei unterschiedliche Elektrodenpaare, die jeweils über eine Agarbrücke (50 g/l Agar in Parsonslösung) mit den Kammern verbunden waren. Das erste Elektrodenpaar war gewebe nah (1 mm Abstand) von der Schleimhaut angebracht um Messartefakte, bedingt durch einen Potentialabfall durch den Lösungswiderstand, zu minimieren. Das zweite Elektrodenpaar (Ag/AgCl-Elektroden) diente der Stromapplikation und wurde in möglichst großem Abstand zu dem Gewebe angebracht, um eine gleichmäßige Stromdichte im Bereich des Gewebes zu erzeugen. Die Messeinrichtung erlaubte das Umschalten zwischen zwei Mess-Modi: dem *Open-circuit-Modus* und dem *Voltage-clamp-Modus* (Abb. 2.9).



**Abb. 2.9: Schaltbilder für (A) Open-circuit Modus und (B) Voltage-clamp Modus**  
(Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von M.Diener)

Bei jedem Versuch wurde anfangs der Open-circuit-Modus gewählt, damit das Gewebe nach dem Einspannen zunächst unbeeinflusst wieder zu Gleichgewichtsbedingungen finden konnte. In diesem Modus erfolgt eine direkte Messung der transepithelialen Potentialdifferenz. Beide Seiten der Kammer waren mit 3,5 ml derselben Lösung aufgefüllt. Dadurch wurden hydrostatischer Druck und chemische Gradienten als Antriebskräfte für Stofftransport ausgeschaltet, somit blieb lediglich der elektrische Gradient, der durch spontane Ionenbewegungen gebildet wird, übrig.

Typisch für das Kolongewebe der Ratte ist eine spontane Sekretion von Anionen, vor allem von  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{HCO}_3^-$ -Ionen (Strabel und Diener 1995). Dadurch wird die serosale (basolaterale) Seite gegenüber der mukosalen (apikalen) Seite positiv aufgeladen. Etwa nach 1 min wurde dann in den Voltage-clamp-Modus gewechselt. Die transepitheliale Potentialdifferenz kann hierbei durch Einspeisen eines Stromes auf einen beliebigen Wert eingestellt werden. Um passive Ionenbewegungen durch den elektrischen Gradienten zu verhindern, wurde für diese Studie eine besondere Form des Voltage-clamps verwendet, der *Short-circuit-Modus*. Der kompensatorische Strom, der notwendig ist, um die Pd auf 0 mV zu klemmen, wird als Kurzschlussstrom  $I_{\text{sc}}$  bezeichnet. Der  $I_{\text{sc}}$  entspricht in seiner Größe somit der Summe aller elektrogenen Ionenbewegungen an dem Epithel. Eine unter diesen Bedingungen gemessene Zunahme des  $I_{\text{sc}}$  ist immer auf einen aktiven Transport zurückzuführen, d. h. entweder ein Netto-Anionentransport von serosal nach mukosal oder ein Netto-Kationentransport in die entgegengesetzte Richtung. Der  $I_{\text{sc}}$  wurde in  $\mu\text{Eq/h}\cdot\text{cm}^2$  (mit  $1 \mu\text{Eq/h}\cdot\text{cm}^2 = 26,9 \mu\text{A/cm}^2$ ), also Ladungsverschiebung eines monovalenten Ions pro Zeit und Gewebefläche, angegeben.

Zur vollständigen Charakterisierung der elektrischen Eigenschaften des Gewebes wurden zusätzlich der Gewebewiderstand ( $R_t$ ) und die Gewebeleitfähigkeit ( $G_t$ ) ermittelt. Hierzu wirkten während der Messungen im Voltage-clamp-Modus Stromimpulse mit einer Amplitude von  $\pm 50 \mu\text{A}$  für eine Dauer von 200 ms auf das Gewebe ein. Mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes konnte nun aus der resultierenden Potentialdifferenz der Gewebewiderstand errechnet werden:

**Spannung (U) = Widerstand (R) · Strom (I) und somit  $R_t = U/I$**

Daraus ergibt sich für die Gewebeleitfähigkeit ( $G_t$ ):

$$G_t = I/U$$

Sie entspricht also dem Kehrwert des Gewebewiderstandes ( $R_t$ ).

### 2.9.3 Versuchsdurchführung und Datenerfassung

Sofort nachdem das Gewebe eingespannt war, wurden beide Seiten der Messkammern mit der unter Kapitel 2.2.2.1 beschriebenen Standard-Parsonslösung befüllt. Während einer 60-minütigen Äquilibrationsphase unter short-circuit-Bedingungen konnte sich der Gewebewiderstand stabilisieren und der Kurzschlussstrom stellte sich auf ein stabiles Plateau ein. Im Anschluss wurden je nach Versuchsreihe verschiedene Substanzen appliziert. Über den Computer wurden die Messwerte von Kurzschlussstrom, Gewebeleitfähigkeit und Potentialdifferenz kontinuierlich erfasst und gespeichert. Zu Beginn eines jeden Versuchstages (bevor das Gewebe in die Kammer eingespannt wurde), wurde zunächst die Potentialdifferenz zwischen den einzelnen Elektroden und der Widerstand der verwendeten Lösung bestimmt und dann von den Messdaten abgezogen. Am Ende des Versuches wurden die Daten in das Tabellen-Kalkulations-Programm Lotus 123 exportiert. Als Basallinie (*Baseline*) galt der  $I_{sc}$  unter basalen Versuchsbedingungen. Die Baseline wurde ermittelt als Durchschnittswert des  $I_{sc}$  aus den letzten drei Minuten vor Substanz-Applikation. Der höchste Wert nach Substanz-Applikation wurde als *Peak* gewertet und die Veränderung zwischen *Baseline* und *Peak* als  $\Delta I_{sc}$  berechnet.

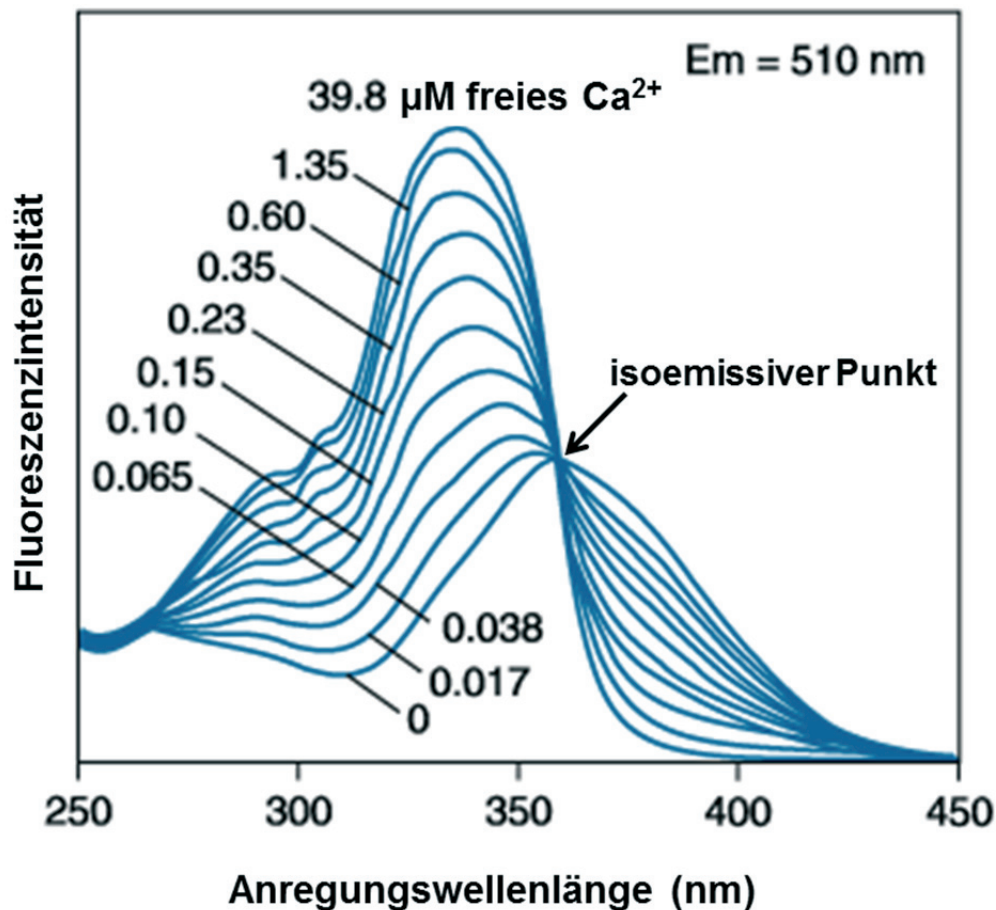
### 2.10 $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging

#### 2.10.1 Theorie des $\text{Ca}^{2+}$ -Imagings

Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging ist eine Methode zur semiquantitativen Bestimmung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in lebenden Zellen. Calcium ist ein wichtiger second messenger, d. h. eine Veränderung der zytosolischen Calciumkonzentration vermittelt intrazelluläre Signalübertragung. Die Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration lässt sich mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen bildlich darstellen. Diese Farbstoffe werden in zwei Gruppen unterteilt: Die Wellenlängen-stabilen (wavelength stable dyes) und die Wellenlängen-ändernden (wavelength shifting dyes) Farbstoffe. Die wavelength stable dyes ändern durch Bindung von Calcium nur ihre Emissionsintensität, die Exzitations- und Emissionswellenlängen bleiben konstant. Bei den wavelength shifting dyes ändert sich deren Anregungswellenlänge sobald diese an Calcium binden. Der gebräuchlichste Farbstoff dieser Gruppe ist Fura-2, welcher auch in der vorliegenden Arbeit Verwendung fand. Fura-2, das an  $\text{Ca}^{2+}$  gebunden ist, hat sein Anregungsmaximum bei einer Wellenlänge von 340 nm, das ungebundene Fura-2 bei 362 nm. Gemessen wird allerdings nicht bei einer Anregungswellenlänge von 362 nm, da diese sehr nah am isoemissiven Punkt des Fura-2-spezifischen Fluoreszenzspektrums liegt (Abb. 2.10). An diesem Punkt ist die Fluoreszenzintensität von Fura-2 unabhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, also immer gleich. Es wird stattdessen bei einer Anregungswellenlänge von 380 nm gemessen. Bei 380 nm ist die Differenz der Fluoreszenzintensität für  $\text{Ca}^{2+}$ -freies und  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenes Fura-2 am größten. Die Lichtemission erfolgt sowohl beim gebundenen als auch beim ungebundenen Farbstoff bei ca. 510 nm. Dadurch, dass gebundenes und freies Fura-2 bei unterschiedlichen Wellenlängen maximal angeregt wird, ergibt sich die Möglichkeit, eine sogenannte Ratio-Messung durchzuführen. Zu diesem Zweck findet zeitlich unmittelbar abwechselnd eine Anregung bei den Wellenlängen von 340 nm und 380 nm statt. Die jeweilige Fluoreszenzintensität wird bei 510 nm gemessen und daraus das Verhältnis (Ratio) der Emission gebildet.

Gegenüber der Einzelwellenlängen-Messung bringt diese Ratio-Messung einige Vorteile mit sich. Zum einen sind die so erfassten Werte der zytosolischen Calciumkonzentration unabhängig von der absoluten Farbstoffkonzentration in der

Zelle. Auch Faktoren wie Zelldicke und Zellgröße spielen keine Rolle. Des Weiteren werden Fehlermöglichkeiten reduziert, die durch Ausbleichen oder „Auslaufen“ des Farbstoffs aus der Zelle entstehen könnten, da diese bei beiden Wellenlängen dieselbe Auswirkung haben und somit durch Bildung der Ratio entweder ganz wegfallen oder zumindest stark reduziert werden (Tsien und Poenie 1986) werden.



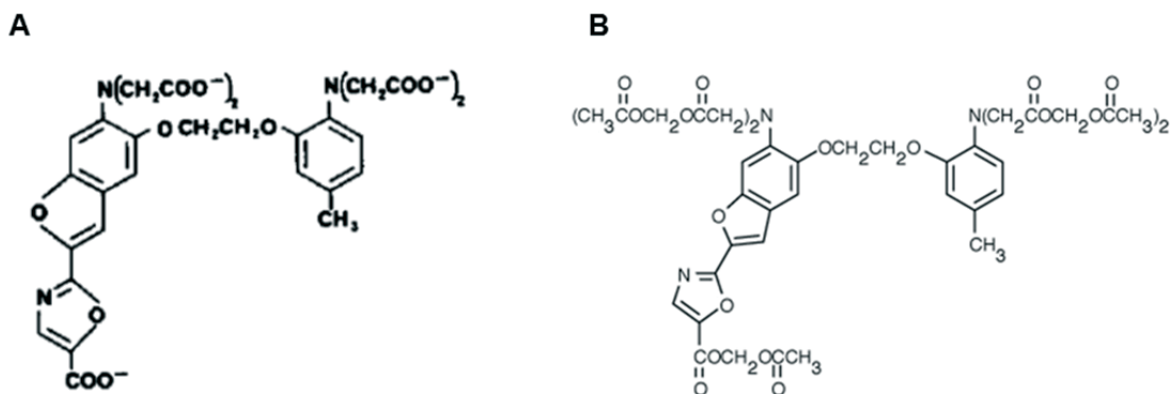
**Abb. 2.10: Exzitationsspektren von Fura-2 bei verschiedenen  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen**

Das Diagramm zeigt die Fluoreszenzintensität von Fura-2 bei einer Emissionswellenlänge ( $E_m$ ) von 510 nm in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge (nm) in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen freien Calciums ( $\mu M$ ).  
(modifiziert nach Haugland 2005)

### 2.10.2 Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2

Fura-2 ist ein Fluoreszenz-Indikator-Farbstoff mit der Grundstruktur eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelators, genauer gesagt einer Ethylenglycol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure-Grundstruktur (Abb. 2.11 A). Der Farbstoff besitzt aufgrund dieser Molekülstruktur eine hohe Selektivität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, was die Bildung eines Fura-2- $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatkomplexes ermöglicht. Die Bindungskurve von  $\text{Ca}^{2+}$  an Fura-2 verläuft sigmoidal. Die Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) ist der Wert, bei dem 50 % des Fura-2 an  $\text{Ca}^{2+}$  gebunden ist. Je kleiner dieser Wert, desto stärker ist die Affinität des Farbstoffs für das Ziel-Ion, in diesem Fall  $\text{Ca}^{2+}$ . Der  $K_d$ -Wert für Fura-2 liegt bei 224 nmol/l. Die Konzentration an freiem zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  liegt in den meisten Zellen bei etwa 100 nmol/l. Das bedeutet, dass bei einer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf einen Stimulus hin noch genug Spielraum nach oben besteht, bevor es zu einer Sättigung des Farbstoffes kommt.

Damit Fura-2 überhaupt ins Zytosol der zu untersuchenden Zellen gelangt, bedient man sich der AM-Form (AM = Acetoxymethylester) des Farbstoffes (Abb. 2.11 B). Diese Form des Farbstoffes ist nicht fluoreszierend. Die AM-Form ist aber lipophil und damit membranpermeabel. Dadurch kann der Farbstoff in das Zytosol der Zelle diffundieren. Dort spalten zelleigene, unspezifische Esterasen die Esterbindungen auf und es entsteht die freie Säureform des Farbstoffes. Das nun geladene Fura-2 ist fluoreszent und membranimpermeabel, kann also nicht mehr aus der Zelle heraus diffundieren (Tsien und Poenie 1986). Der nicht in die Zellen aufgenommene Farbstoff kann durch Waschen entfernt werden.

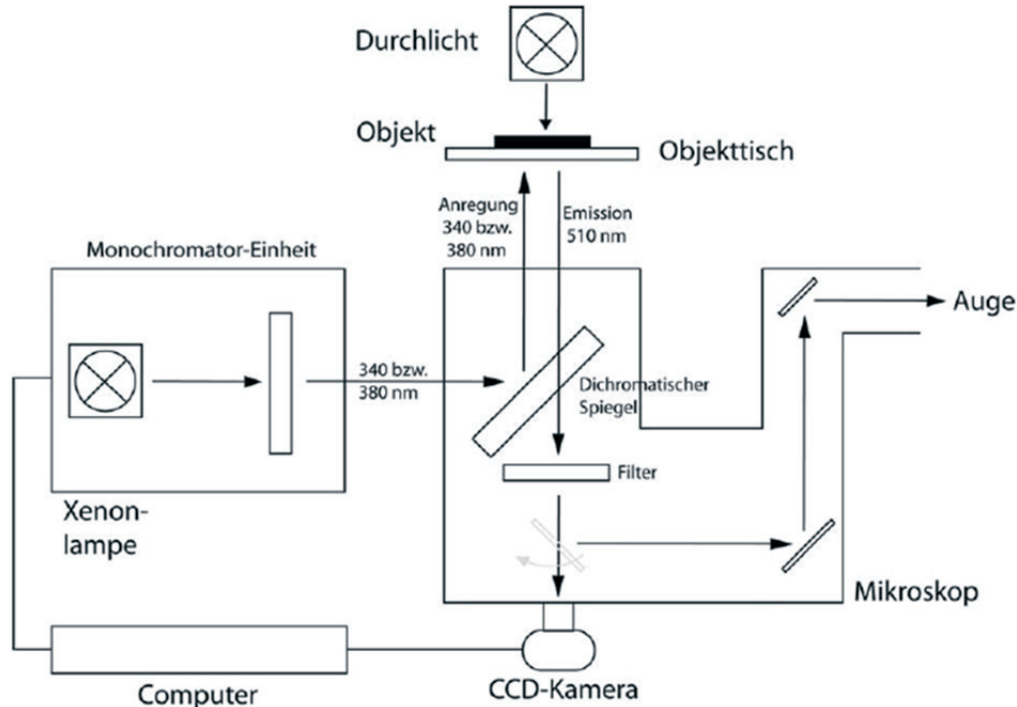


**Abb. 2.11: A) Strukturformel von Fura-2, B) Strukturformel von Fura-2 AM**  
(Quellen: A) Grynkiewicz et al. 1985, B) Haugland 2005)



### 2.10.3 Der Imaging-Messstand

Die Messungen wurden mit einem inversen Lichtmikroskop (IX 50, Olympus Optical, Tokyo, Japan) durchgeführt, welches mit einem Epifluoreszenz-Setup und einer Imageanalyse-Software (Till-Photonics, Martinsried, Deutschland) ausgestattet war. Eine Xenonlampe diente als Lichtquelle. Die erzeugten Lichtwellen wurden über einen Spiegel in den Lichtleiter gelenkt. Über einen dichromatischen Spiegel wurde das Anregungslicht auf das Objekt geleitet. Durch Anregung des Farbstoffs mit Licht der Wellenlänge 340 bzw. 380 nm wurde eine Emission (gemessen bei 510 nm) erzeugt, die den dichromatischen Spiegel passieren konnte. Das emittierte Licht wurde von einer CCD-Kamera (charge coupled device; Till Photonics, Martinsried, Deutschland) aufgenommen und an einen Computer gesendet. So konnten während der Versuche Veränderungen der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in Form von sog. *live displays* aufgezeichnet werden. Durch einen beweglichen Spiegel konnte das Licht alternativ zum Auge oder zur Kamera weitergeleitet werden. Abbildung 2.12 zeigt den Aufbau des Fura-2-Messstandes.



**Abb. 2.12: Aufbau des  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Messstandes**

(Verwendung der Grafik mit freundlicher Genehmigung von M.Diener)

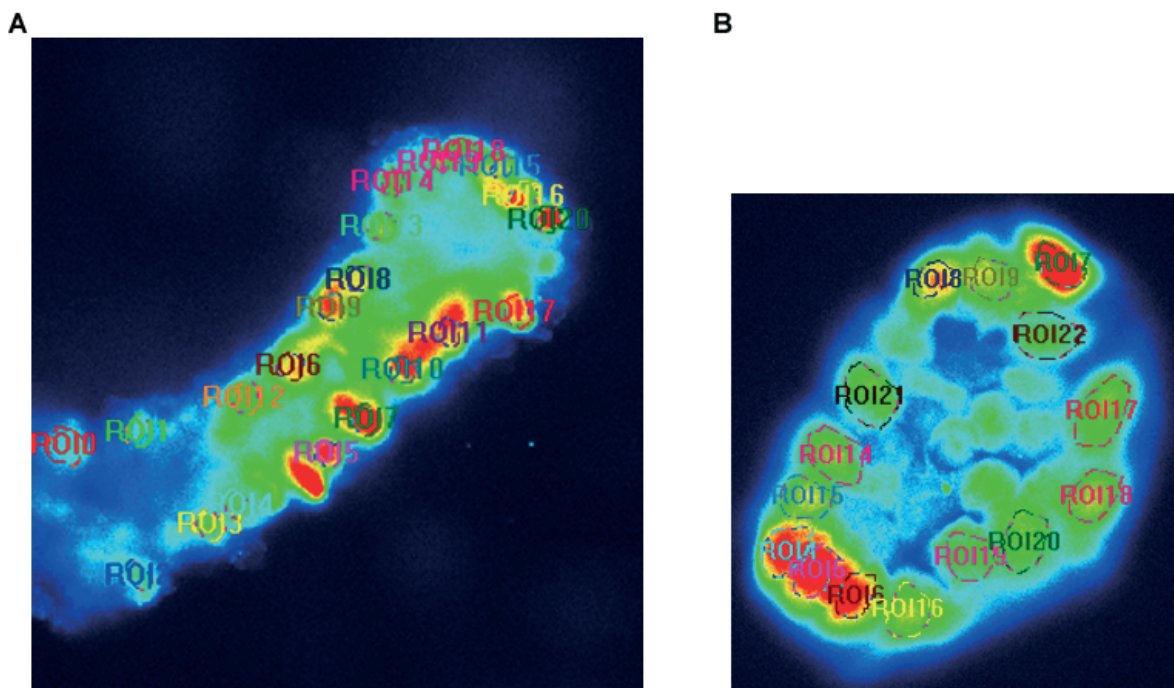
### 2.10.4 Die Imaging-Messkammer mit Perfusionssystem

Die Messkammer bestand aus einer Metallplatte mit einer kreisrunden Aussparung in der Mitte. Der Durchmesser dieses Ausschnittes betrug 1,8 cm für die Messungen der isolierten Krypten und 1 cm für die Messungen an HT29-Zellen. Auf diese Aussparung wurden die Deckgläschen mit dem zu untersuchenden Gewebe aufgelegt. Zur Befestigung der Deckgläschen wurde ein Teflon-Ring mit einer Öffnung gleichen Durchmessers auf die Metallplatte aufgesteckt und festgeschraubt. Durch die Form des Teflon-Rings konnte oberhalb des Deckgläschens bis zu 2 bzw. 3 ml Flüssigkeit zugegeben werden. Die gesamte Vorrichtung konnte nun auf dem Objektisch fixiert und an ein Perfusionssystem angeschlossen werden. Zu diesem Zweck wurde eine Schlauchpumpe (Typ 11OSC.G18.CH5B, Ole Dich Instrumentsmakres APS, Hvidovre, Dänemark) für gesteuerten Zu- und Ablauf angeschlossen. Die Zu- und Ablaufschläuche wurden gegenüberliegend an etwa 2 cm hohen Teflon-Pins befestigt, sodass das Kammervolumen während der Perfusion konstant gehalten wurde. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug 250 ml/h (Krypten) bzw. 150 ml/h (HT29-Zellen). Alle Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 2.10.5 Versuchsdurchführung der $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Experimente wurden mit isolierten Krypten des Rattenkolons und mit der HT29/B6-Zelllinie durchgeführt. Die Krypten wurden wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben isoliert und auf, mit Poly-L-Lysin beschichteten, Deckgläschen fixiert. Nun wurden die Krypten mit der Fura-2-AM-Lösung (siehe Kap. 2.2.4.1) für eine Stunde bei Raumtemperatur aufgeladen. Die Inkubation wurde unter Lichtschutz durchgeführt. Um nicht in die Zellen aufgenommenen, überschüssigen Farbstoff zu entfernen, wurden die Krypten nach Ablauf der Inkubationszeit mit Auffangtyrode gewaschen und anschließend bis zur Versuchsdurchführung in der gleichen Pufferlösung bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz aufbewahrt. Der Lichtschutz ist nötig, um ein Ausbleichen des Farbstoffes zu verhindern. Für das Aufladen der HT29/B6-Zellen wurde wie oben bei den Krypten beschrieben verfahren, mit dem Unterschied, dass die Waschschrte mit Standard-Tyrode durchgeführt wurden.

Bei dem jeweils zu messenden Plättchen wurde zunächst mittels Pipette die Lösung entfernt. Anschließend wurde das Glasplättchen in die Messkammer eingespannt und diese auf dem Objektisch befestigt. Durch ein 20x Objektiv wurde bei Durchlicht nach geeigneten Krypten bzw. HT29-Zellen gesucht und diese dann entsprechend in die Mitte des Blickfeldes justiert. Davon wurde mithilfe der Imaging-Software ein *Snapshot* erstellt, der auf dem Computerbildschirm in Falschfarben dargestellt war. Anhand dieser Darstellung wurden einzelne Zellen manuell als Messbereich (ROI = region of interest) festgelegt (Abb. 2.13). Für jede Messung wurde ein ROI außerhalb der Krypte bzw. der HT29-Zellen als Leerwertmessbereich mit erfasst.



**Abb. 2.13: Falschfarbendarstellung...**

A: ...einer mit Fura-2 AM beladenen isolierten Krypte

B: ...von mit Fura-2 AM beladenen HT29 Zellen

Kreise bezeichnen die Messbereiche = ROIs

Zu Beginn des Versuches wurde das Gewebe mit Standard-Tyrodelösung superfundiert und einige Minuten lang eine Baseline aufgenommen. Nach Stabilisierung des Fluoreszenz-Signals wurde die Perfusion ausgestellt und Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l) vorsichtig in die Messkammer pipettiert. Die Veränderung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde gemessen und für die spätere Auswertung aufgezeichnet. Inhibitoren wurden 10 Minuten vor Zugabe von Propionat eingewaschen. Am Ende eines jeden Versuches wurde eine Vitalitätskontrolle mit

Cyclopiazonsäure (CPA;  $1,5 \cdot 10^{-5}$  mol/l) durchgeführt. Cyclopiazonsäure verhindert die Wiederaufnahme von zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das endoplasmatische Retikulum durch Blockade einer dort lokalisierten  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA, sarcoplasmic-endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) und sorgt so unabhängig von der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration für einen Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytosol (Moncoq et al. 2007). Zur Datenerfassung und Steuerung des Versuchsablaufs wurde die Imaginganalyse-Software TILLvisION verwendet. Das Protokoll wurde so festgelegt, dass alle 5 Sekunden ein Bildpaar aufgenommen wurde. Dazu wurde die Emission bei einer Belichtung mit einer Anregungswellenlängen von 340 nm (Belichtungsdauer: 70 ms) erfasst, gefolgt von einer unmittelbar darauf folgenden Messung der Emission bei einer Belichtung mit einer Anregungswellenlängen von 380 nm (Belichtungsdauer: 70 ms). Durch die Messung der Bildpaare alle 5 s betrug die Datensammelrate 0,2 Hz.

Während des gesamten Versuches konnten die emittierten Fluoreszenzsignale am Computerbildschirm verfolgt werden. Das Programm errechnete zudem gleichzeitig die Ratio aus der Emission beider Anregungswellenlängen, sodass die Wirkung einer Substanzzugabe auf die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration direkt beobachtet werden konnte. Stieg die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an, so stieg auch die Kurve des Ratio-Signals an und umgekehrt sank das Signal ab, wenn die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration geringer wurde. Alle erfassten Werte wurden gespeichert und danach mit verschiedenen Datenanalyse-Programmen ausgewertet. Als Basallinie (*Baseline*) galt die Fura-Ratio unter basalen Versuchsbedingungen. Die Baseline wurde ermittelt als Durchschnittswert der Fura-Ratio aus den letzten drei Minuten vor Substanz-Applikation. Der höchste Wert nach Substanz-Applikation wurde als *Peak* gewertet und die Veränderung zwischen *Baseline* und *Peak* als  $\Delta\text{Fura-Ratio}$  berechnet.

### 2.11 Messung der Acetylcholinfreisetzung mittels HPLC

Für diese Versuche wurden zunächst Mukosapräparate (siehe Kap. 2.4.2) in die Ussingkammer eingespannt. Nach der Stabilisierungsphase von 60 min wurden dem Puffer auf basolateraler Seite Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l) und Eserin ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l) zugesetzt. Nach 15 min wurde mit der Probenentnahme begonnen. Zu den Zeitpunkten  $t_0$ ,  $t_5$ , und  $t_{10}$  min wurden jeweils 250  $\mu$ l Puffer von der basolateralen Seite entnommen und sofort durch frischen Puffer ersetzt. Direkt nach Entnahme der Probe bei  $t_{10}$  wurde auf der apikalen Seite Propionat appliziert (2 mmol/l) und zu den Zeitpunkten  $t_{15}$  und  $t_{20}$  nochmals zwei Proben von basolateral entnommen. Die Proben wurden bis zur Messung des Acetylcholingehaltes bei  $-80$  °C gelagert.

Der Gehalt an Acetylcholin in den Proben wurde mithilfe einer Microbore High-performance liquid chromatography (HPLC) bestimmt. Diese Messungen wurden am Institut für Pharmakologie, Goethe-Universität, Frankfurt im Labor von Prof. J. Klein durchgeführt. Es wurden die Geräte und Lösungen wie bei Mohr et al. (2013) beschrieben verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Datenanalyseprogramm Microsoft Excel. Die gemessene Acetylcholinmenge bei  $t_0$  galt als Ausgangswert für die Bestimmung der Acetylcholinfreisetzung.

### 2.12 Statistik

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Mittelwerten  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte (SEM) oder in Originalkurven. Wurden die Ergebnisse in Form von Balkendiagrammen abgebildet, stellt die Höhe der Säule den Mittelwert dar, der Fehlerbalken den SEM. Bei den  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Versuchen bezeichnet  $n$  die Anzahl der einzelnen gemessenen Kryptenepithelzellen bzw. HT29/B6 Zellen. Bei den Ussingkammer-Versuchen steht  $n$  für die Anzahl der verwendeten Gewebe. Unabhängig davon wurden die Gewebe bzw. Zellen für alle Versuche jeweils aus mindestens drei verschiedenen Tieren bzw. Zellkulturansätzen gewonnen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen. Um zwei Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde entweder ein Student's t-Test oder ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Ein F-Test legte fest, welche dieser beiden Methoden angewendet wurde.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Das epitheliale cholinerge System des distalen Kolons der Ratte**

Untersucht wurde die Expression der einzelnen Komponenten des nicht-neuronalen cholinergen Systems sowohl auf Protein-Ebene mittels Immunfluoreszenz als auch auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR. Es schloss sich eine funktionelle Analyse der einzelnen Komponenten mithilfe spezifischer Inhibitoren in Ussingkammer-Experimenten an.

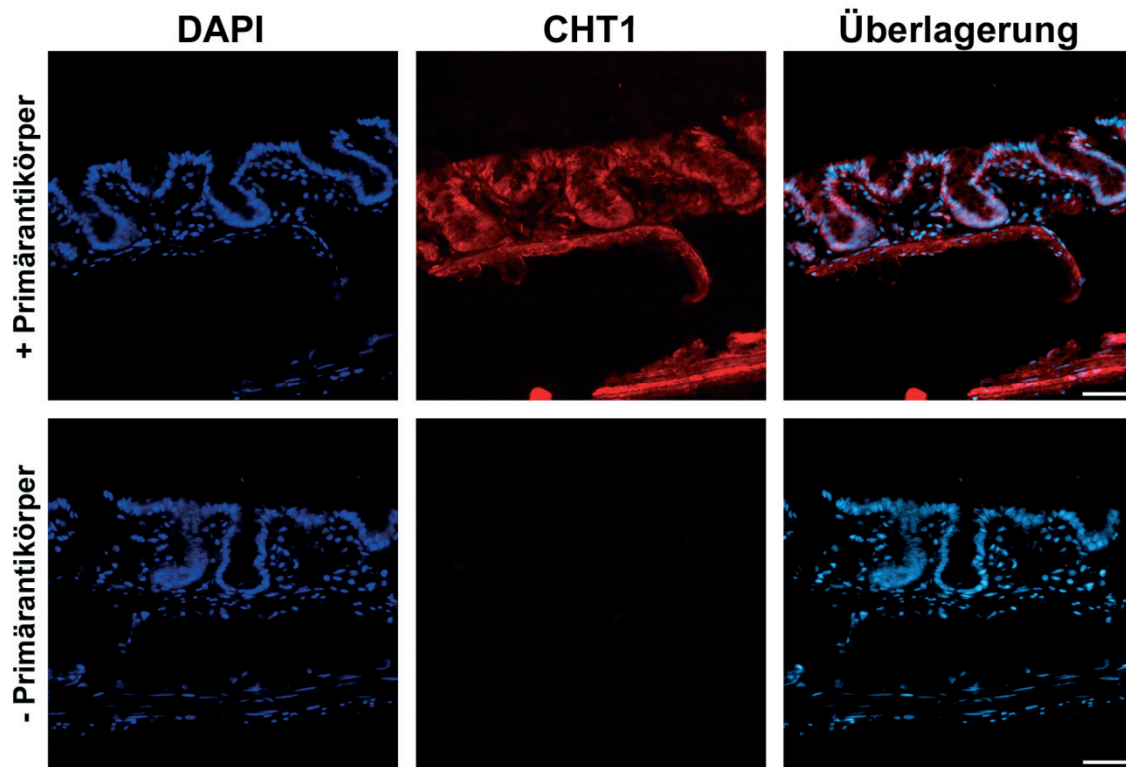
#### **3.1.1 Aufnahme von Cholin in die Kolonepithelzelle**

Die Aufnahme von Cholin in das Zytosol ist der limitierende Faktor für die Acetylcholinsynthese. In Neuronen wird Cholin durch den hochaffinen Cholintransporter (CHT1) aufgenommen (Okuda und Haga 2000).

##### **3.1.1.1 Immunhistochemischer Nachweis des CHT1**

Um zu untersuchen, ob der CHT1 auch von den Epithelzellen des distalen Kolons der Ratte exprimiert wird, wurden Immunfluoreszenzmarkierungen an Gewebeschnitten des distalen Kolons (siehe Kap. 2.6) durchgeführt.

Wie in Abbildung 3.1 (obere Reihe) zu erkennen ist, wird der hochaffine Cholintransporter in den Kolonepithelzellen exprimiert. Ein Fluoreszenzsignal ist entlang der gesamten Kryptenachse zu erkennen und ist besonders ausgeprägt im Oberflächenepithel und im mittleren Kryptenabschnitt vorhanden. Eine intensive CHT1-Immunoreaktivität war auch im Bereich der Muscularis propria zu sehen. Die Negativkontrollen, die nach demselben Protokoll, jedoch ohne den Primärantikörper angefertigt wurden, zeigten keine Immunoreaktivität, sodass eine unspezifische Bindung des verwendeten Sekundärantikörpers ausgeschlossen werden konnte (Abb. 3.1, untere Reihe).



**Abb. 3.1: Immunfluoreszenzmarkierung des CHT1 am distalen Kolon der Ratte**

*Obere Reihe:* Markierung des CHT1. *Untere Reihe:* Negativkontrolle.

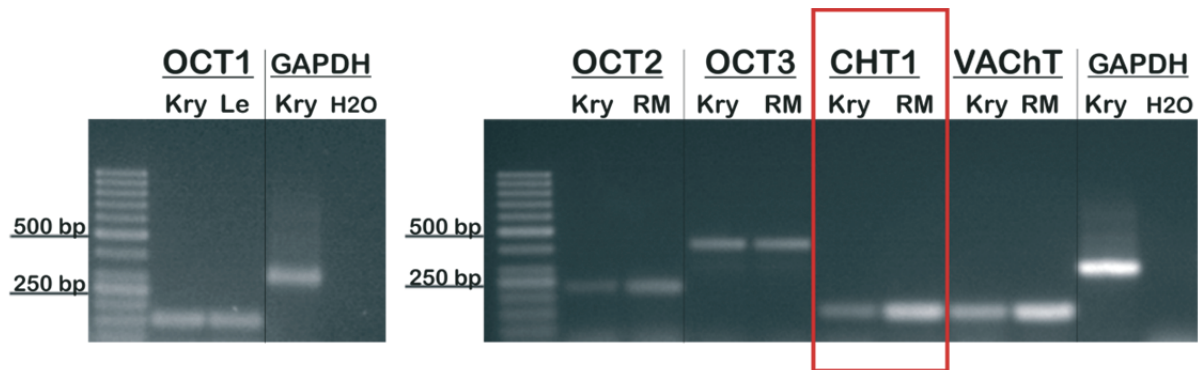
Orientierung im Gewebe für jedes Bild: *Oberer Bildteil:* Tunica mucosa mit den Krypten, *Unterer Bildteil:* Tunica submucosa und Tunica muscularis. *Linke Spalte:* DAPI-Kernfärbung (blau). *Mittlere Spalte:* Cy3-Aufnahme für CHT1 (rot). *Rechte Spalte:* Überlagerungsaufnahme beider Färbungen. Eichbalken = 50  $\mu\text{m}$ . Die Abbildung zeigt ein typisches Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

### 3.1.1.2 Molekularbiologischer Nachweis des CHT1

Um die mittels Immunfluoreszenz nachgewiesene Expression des CHT1 auf mRNA-Ebene zu bestätigen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Die hierfür verwendete RNA wurde aus isolierten Kolonkrypten gewonnen (siehe Kap. 2.8.2) um eine Kontamination mit neuronalem Material zu vermeiden. Als Referenzgewebe für den CHT1 diene Rückenmark der Ratte. Die Sequenz des verwendeten Primerpaares und die entsprechende Quelle kann Tabelle 2.6 entnommen werden.

Als Positivkontrolle für die Effizienz der PCR-Reaktion wurde ein Primerpaar für das Housekeeping-Gen GAPDH eingesetzt. Um eine Verunreinigung des verwendeten RNase-freien Wassers mit genomischer DNA auszuschließen, wurden je Versuchstag eine PCR-Reaktion mit RNase-freiem Wasser anstelle der cDNA als Negativkontrolle (jeweils mit dem Primerpaar für GAPDH) mitgeführt.

Abbildung 3.2 zeigt, dass der CHT1 im Kolonepithel auch auf mRNA-Ebene nachweisbar ist. Die Größe der Amplifikate von Referenzgewebe und Kolonkrypten stimmen überein und entsprechen der erwarteten Produktlänge von 150 bp. GAPDH (303 bp) diente als interne Kontrolle der Qualität der PCR-Reaktion. In der Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O anstelle cDNA, wurde wie gefordert kein Produkt amplifiziert.



**Abb. 3.2: Agarosegele mit den PCR-Produkten für OCT1 - 3, CHT1 und VACHT**

Die Agarosegele zeigen die Amplifikate für die organischen Kationentransporter (OCT1 - 3), den hochaffinen Cholintransporter (CHT1), und den vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT). Die niedermolekularen PCR-Produkte stellen Primerdimere dar. *Kry* = isolierte Kolonkrypten, *Le* = Leber, *RM* = Rückenmark, *H2O* = Wasserkontrolle ohne Einsatz von cDNA. Die Abbildung zeigt ein typisches Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.



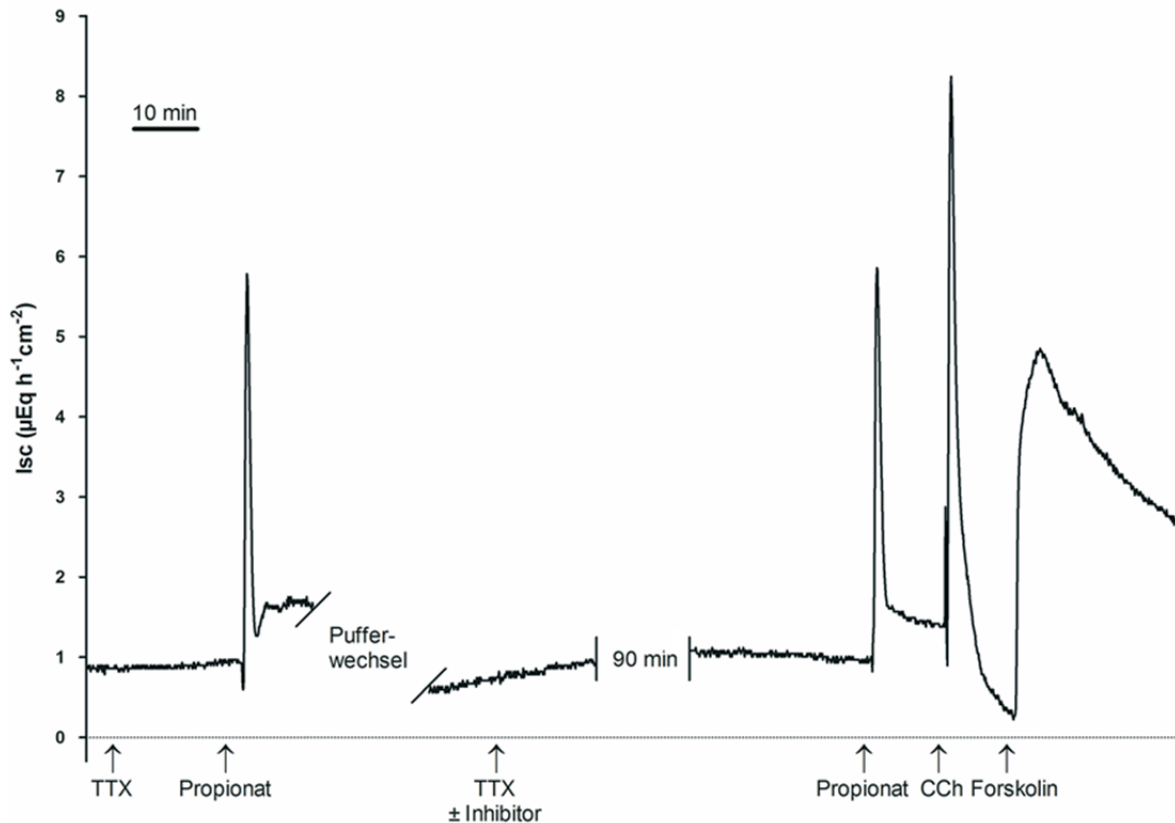
#### **3.1.1.3 Untersuchung der Bedeutung des CHT1 für die epitheliale Acetylcholinsynthese mithilfe von Ussingkammer-Versuchen**

Nachdem die Expression des CHT1 nachgewiesen war, stellte sich die Frage nach der funktionellen Bedeutung dieses Transporters für die Acetylcholinsynthese in den Kolonepithelzellen. Zu diesem Zweck wurden Ussingkammer-Versuche durchgeführt. Wie in Kapitel 1.4.6 beschrieben, induziert die kurzkettige Fettsäure Propionat eine Acetylcholinfreisetzung aus dem Kolonepithel der Ratte, welches wiederum eine Sekretion von Chloridionen stimuliert. Diese  $\text{Cl}^-$ -Sekretion ist in der Ussingkammer als transienter Anstieg im Kurzschlussstrom ( $I_{\text{sc}}$ ) messbar. Diese Eigenschaft wurde genutzt, um die funktionelle Bedeutung der einzelnen Transporter und Enzyme des non-neuronalen cholinergen Systems am Kolonepithel näher zu untersuchen. Um die Rolle des CHT1 zu klären, wurde das in Abbildung 3.3 gezeigte Depletions-Protokoll mit zweimaliger Propionat-Applikation an demselben Gewebe verwendet. Alle Versuche wurden in Anwesenheit von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) durchgeführt, um eine mögliche neuronale Restaktivität zu unterdrücken. Bei Tetrodotoxin handelt es sich um ein Neurotoxin, welches die Weiterleitung von Aktionspotentialen in enterischen Neuronen durch Blockade spannungsabhängiger  $\text{Na}^+$ -Kanäle unterdrückt (Catterall 1980). Dies ist notwendig, um eine Freisetzung ausschließlich von epithelialem Acetylcholin durch Propionat auszulösen (Yajima et al. 2011a), da in Abwesenheit des Neurotoxins diese kurzkettige Fettsäure auch enterische Neurone zu stimulieren vermag (Yajima 1988). Die erste Zugabe von Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l auf der mukosalen Seite) diente der Freisetzung von präformiert in den Kolonepithelzellen vorhandenem Acetylcholin. Dieses wurde in das serosale Kompartiment freigesetzt und führte zu einem transienten Anstieg im  $I_{\text{sc}}$  von  $6,94 \pm 1,13 \mu\text{Eq/h} \cdot \text{cm}^2$  ( $n = 7$ , siehe Abb. 3.4 und Tab. 3.1). Nach Erreichen der Baseline wurde ein Pufferwechsel (mukosal und serosal) durchgeführt, um Acetylcholin und Propionat auszuwaschen.

Danach erfolgte die erneute Zugabe von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) und von Hemicholinium-3 ( $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l auf der serosalen Seite), einem Inhibitor des CHT1 (Cannon 1994). Bei den Kontrollversuchen wurde lediglich Tetrodotoxin zugegeben. Nun folgte eine 120-minütige „Regenerationsphase“, die sich in Vorversuchen als notwendig erwies für eine Resynthese von Acetylcholin und die

Resensitivierung der Propionat-Rezeptoren. Im Anschluss erfolgte eine erneute Applikation von Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l auf der mukosalen Seite), welche bei den Kontrollversuchen (ohne Inhibitor) einen Anstieg des  $I_{sc}$  zur Folge hatte, der sich in seiner Höhe nicht von der Antwort auf die erste Propionatzugabe unterschied (siehe Abb. 3.4 und Tab. 3.1). Im Falle einer Hemmung des CHT1 war der Anstieg im  $I_{sc}$  nach der zweiten Propionat-Zugabe verglichen mit dem Anstieg nach der ersten Zugabe vermindert (siehe 3.4 und Tab. 3.1). Vergleicht man den Anstieg im  $I_{sc}$  nach der zweiten Propionat-Applikation in Anwesenheit von Hemicholinium-3 gegen den  $\Delta I_{sc}$  bei den Kontrollgeweben, so ist dieser im Falle einer CHT1-Blockade signifikant gehemmt.

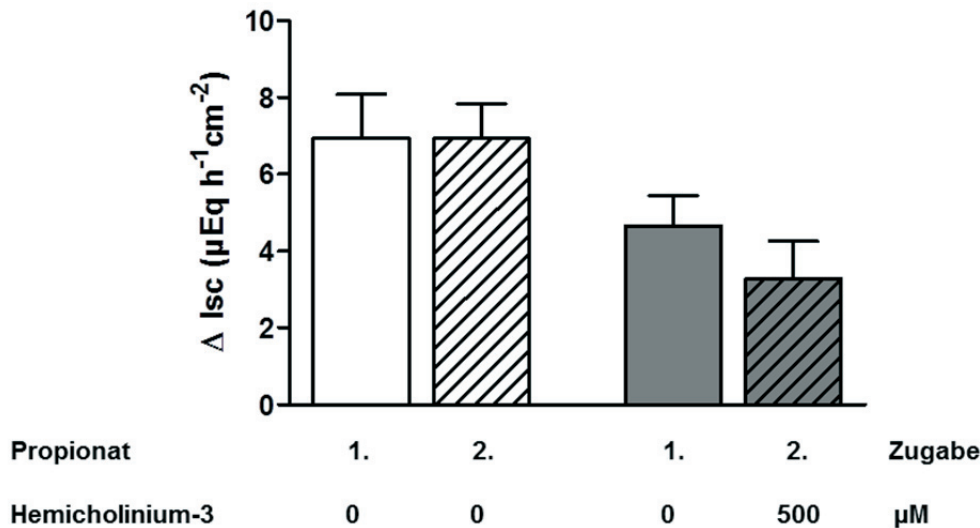
Auf den ersten Blick scheint dieses Ergebnis die Hypothese zu stützen, dass der CHT1 der Cholinaufnahme für die epitheliale Acetylcholinsynthese dient. Allerdings ist bekannt, dass Hemicholinium-3 direkt mit cholinergen Rezeptoren interagiert (Madden und Mitchelson 1975). Deshalb wurde im Anschluss an die zweite Propionat-Applikation der cholinerge Agonist Carbachol ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l auf der serosalen Seite) zugegeben. Und wie Tabelle 3.1 zu entnehmen ist, war der Carbachol-induzierte Anstieg im  $I_{sc}$  bei den mit Hemicholinium-3 behandelten Geweben gegenüber den Kontrollgeweben signifikant vermindert. Am Ende eines jeden Versuches wurde Forskolin ( $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l auf der mukosalen und serosalen Seite), ein Aktivator der Adenylatcyclase, zugegeben um toxische Effekte des verwendeten Inhibitors auf das Gewebe auszuschließen. Hemicholinium-3 hatte keinen Einfluss auf den Anstieg des  $I_{sc}$  nach Forskolin-Zugabe (siehe Tab. 3.1).



**Abb. 3.3: Depletions-Protokoll für die Ussingkammer-Versuche an Mukosapräparaten**

Dieses Protokoll wurde verwendet für die Untersuchung der Funktion des CHT1, des VACHT, der ChAT und der CarAT. Die erste Propionatzugabe diente der Depletion von präformiertem Acetylcholin im Kolonepithel. Etwa 140 min später erfolgte eine erneute Zugabe von Propionat, um zu überprüfen, ob der Anstieg im  $I_{sc}$  durch die Zugabe der entsprechenden Inhibitoren gegenüber der Kontrolle vermindert ist.

Die Grafik zeigt einen Original-Kurvenverlauf eines Ussingkammer-Versuches. TTX = Tetrodotoxin, CCh = Carbachol; die schrägen Striche zeigen an, dass Daten aus Gründen der Übersichtlichkeit ausgeblendet wurden, die senkrechten Striche stehen für eine Achsenunterbrechung. Konzentrationen der eingesetzten Substanzen: TTX:  $10^{-6}$  mol/l serosal; Propionat  $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l mukosal; Carbachol  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l serosal; Forskolin  $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l mukosal und serosal.



**Abb. 3.4: Inhibition des CHT1 durch Hemicholinium-3**

Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l, mukosal) wurde zunächst unter Kontrollbedingungen appliziert, d. h. in Abwesenheit des Inhibitors (1. Zugabe) und dann nochmals in Abwesenheit oder Anwesenheit von Hemicholinium-3 ( $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l, serosal; 2. Zugabe). Die weißen Balken stehen für die Kontrollen ohne Inhibitor, die grauen Balken für die Versuche mit Hemicholinium-3. Die gestrichelten Balken zeigen jeweils die Antwort auf die zweite Zugabe von Propionat. Alle Versuche wurden in Anwesenheit von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) durchgeführt. Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg des  $I_{sc}$  ( $\Delta I_{sc}$ ) im Vergleich zu einer über 3 min gemessenen Baseline direkt vor der jeweiligen Applikation dar. Die vertikalen Linien stehen für den SEM;  $n = 7 - 8$ . Statistik und Vitalitätskontrollen mit Carbachol und Forskolin siehe Tabelle 3.1.

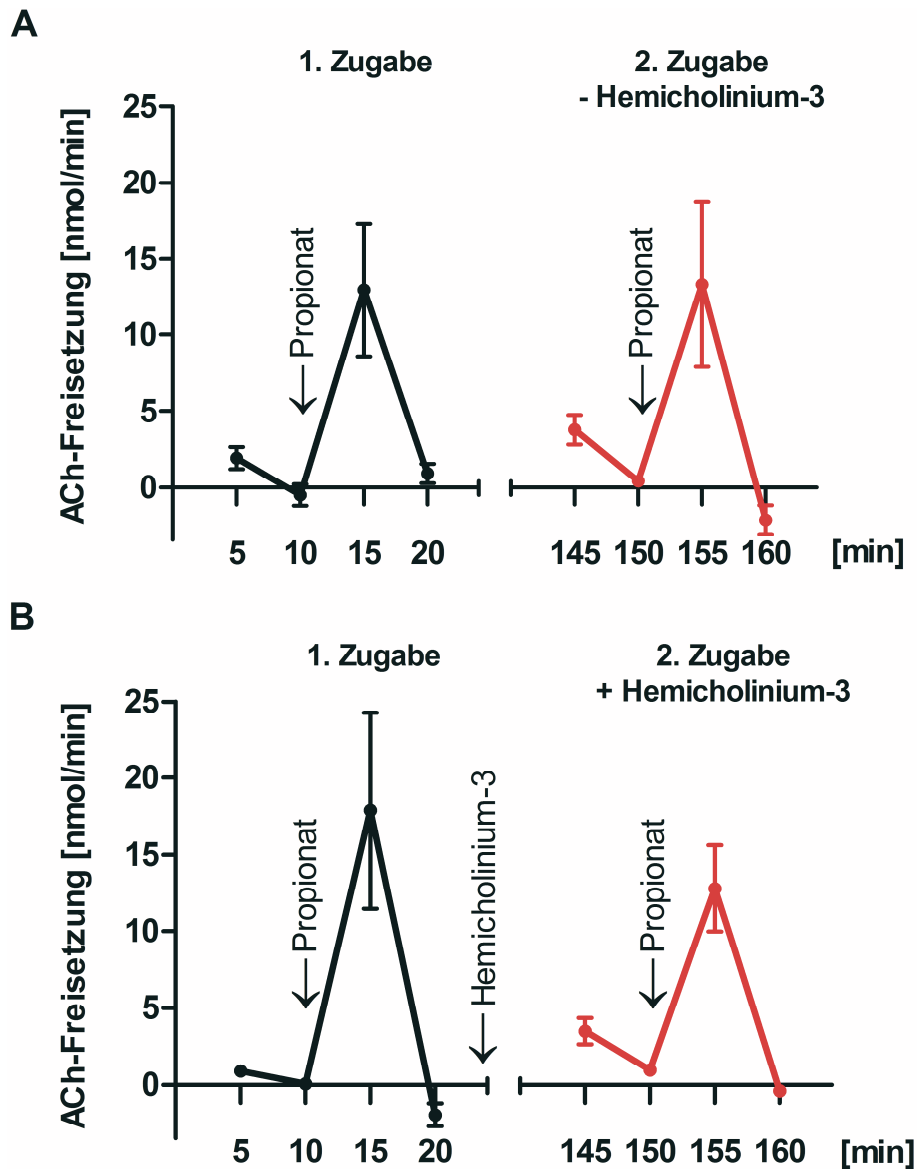
**Tab. 3.1: Effekt des CHT1-Inhibitors Hemicholinium-3 auf den  $I_{sc}$  am Kolonepithel**

Inhibitor	1. Propionat-Zugabe (- Inhibitor)	2. Propionat-Zugabe (± Inhibitor)	Carbachol	Forskolin	n
	$\Delta I_{sc}$ ( $\mu\text{Eq/h} \cdot \text{cm}^2$ )				
- Hemicholinium-3	$6,94 \pm 1,13$	$6,93 \pm 0,91$	$8,25 \pm 1,02$	$4,91 \pm 0,87$	7
+ Hemicholinium-3	$4,65 \pm 0,79$	$3,27 \pm 1,00$	$4,21 \pm 0,56 *$	$4,88 \pm 0,42$	8

Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l, mukosal) wurde zunächst unter Kontrollbedingungen appliziert, d. h. in Abwesenheit des Inhibitors und dann nochmals in Abwesenheit (erste Zeile) oder Anwesenheit von Hemicholinium-3 ( $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l, serosal; zweite Zeile). Am Ende des Experiments wurde zunächst Carbachol ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l, serosal) und nach Erreichen der Baseline Forskolin ( $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l, mukosal und serosal) zugegeben. Alle Versuche wurden in Anwesenheit von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) durchgeführt. Alle Daten stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM dar;  $n = 7 - 8$ . \*  $P < 0.05$  versus  $\Delta I_{sc}$  in Abwesenheit des Blockers.

### **3.1.1.4 Untersuchung der Bedeutung des CHT1 für die epitheliale Acetylcholinsynthese mithilfe von HPLC-Messungen**

Mithilfe der Messungen des Kurzschlussstromes war es nicht möglich zwischen einer tatsächlichen Inhibierung der Acetylcholinsynthese bzw. der Acetylcholinfreisetzung und einer unspezifischen Blockade der cholinergen Rezeptoren durch Hemicholinium-3 zu unterscheiden. Deshalb musste die tatsächlich freigesetzte Menge an Acetylcholin nach Stimulation mit Propionat an Mukosapräparaten bestimmt werden. Hierzu wurde eine HPLC-Analyse von Pufferproben im Labor von Prof. Dr. Jochen Klein (Institut für Pharmakologie, Universität Frankfurt) durchgeführt. Für die Gewinnung der Pufferproben wurde im Prinzip dasselbe Protokoll wie in Kapitel 3.1.1.3 beschrieben verwendet, mit dem einzigen Unterschied, dass zu definierten Zeitpunkten 250 µl des serosalen Puffers entnommen wurden. Die entnommene Puffermenge wurde anschließend sofort durch frischen Puffer ersetzt. Die Proben der Zeitpunkte  $t_0 - t_{10}$  dienten der Messung der basal freigesetzten Menge an Acetylcholin (siehe Abb. 3.5) aus dem Kolonepithel. Unmittelbar nach Entnahme der Probe  $t_{10}$  wurde Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l) auf der mukosalen Seite appliziert, was eine transiente Freisetzung epithelialen Acetylcholins stimuliert (siehe Abb. 3.5 A und B,  $t_{15}$  und  $t_{20}$ ). Bei den Kontrollgeweben (siehe Abb. 3.5 A) war die auf die zweite Propionatzugabe ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l, mukosal) freigesetzte Menge Acetylcholin im Vergleich zu der nach der ersten Zugabe nahezu gleich. Wurde das Gewebe jedoch mit Hemicholinium-3 ( $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l auf der serosalen Seite) inkubiert, dann war die freigesetzte Menge an Acetylcholin nach der zweiten Zugabe von Propionat nur geringfügig (um ca. 30 %) und statistisch nicht signifikant verringert im Vergleich zur initialen Acetylcholinfreisetzung in Abwesenheit von Hemicholin-3 (Abb. 3.5 B). Die Versuche wurden in Anwesenheit von TTX ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) und Eserin ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l auf der serosalen Seite) durchgeführt. Eserin, ein Inhibitor der Acetylcholinesterase(n), wurde eingesetzt um den Abbau von Acetylcholin in den Pufferproben zu verhindern.



**Abb. 3.5: Acetylcholinfreisetzung in das serosale Kompartiment nach Stimulation mit Propionat**

**A:** Acetylcholinfreisetzung unter Kontrollbedingungen (ohne Inhibitor) in das basolaterale Kompartiment der Mukosapräparate. Die Freisetzung steigt nach Applikation von Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l auf der mukosalen Seite) transient an. Nach der Probenentnahme zum Zeitpunkt 20 min wurde Propionat ausgewaschen. Zwei Stunden später wurde Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l auf der mukosalen Seite, rote Linie) erneut appliziert und induzierte erneut eine Acetylcholinfreisetzung von annähernd der gleichen Menge.

**B:** Acetylcholinfreisetzung in das basolaterale Kompartiment der Mukosapräparate bei Blockade des CHT1. Die schwarze Linie zeigt die Acetylcholinfreisetzung vor und nach Propionat-Applikation ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l auf der mukosalen Seite). Nach der Probenentnahme zum Zeitpunkt 20 min wurde Propionat ausgewaschen und Hemicholinium-3, ein Inhibitor des CHT1, auf basolateraler Seite zugegeben ( $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l). Die rote Linie zeigt die freigesetzte Menge an Acetylcholin nach der zweiten Propionat-Applikation ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l auf der mukosalen Seite) zwei Stunden später. Nach einer Hemmung des CHT1 ist die Acetylcholinfreisetzung tendenziell vermindert (statistisch nicht signifikant). Alle Versuche wurden in Anwesenheit von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) und Eserin ( $10^{-5}$  mol/l auf der serosalen Seite) durchgeführt. Alle Daten stellen Mittelwerte dar. Die vertikalen Linien stehen für den mittleren Fehler des Mittelwertes (SEM);  $n = 10$ .

### **3.1.2 Acetylcholinsynthese in der Kolonepithelzelle**

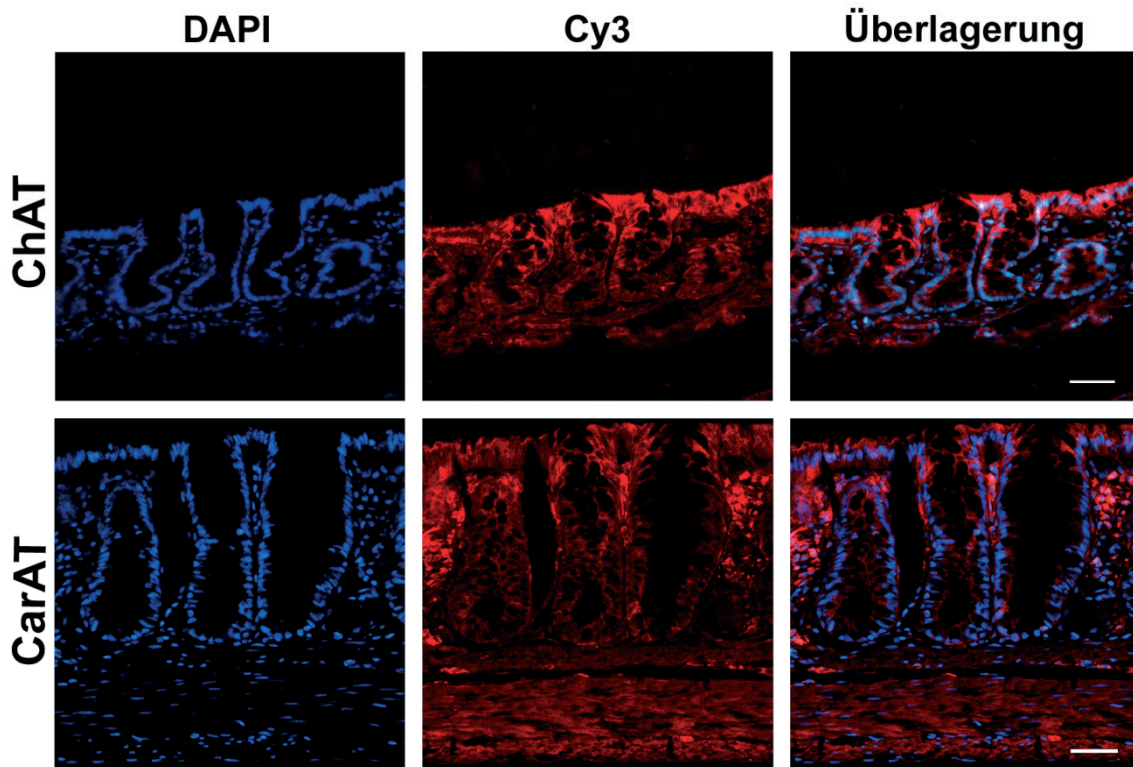
Acetylcholin wird aus Cholin und Acetyl-Coenzym A (AcetylCoA) durch die Cholinacetyltransferase (ChAT) synthetisiert (Wu und Hersh 1994). Neben der ChAT ist auch die ubiquitär (u. a. in Herz- und Skelettmuskel) vorkommende Carnitinacetyltransferase (CarAT) zur Acetylcholinsynthese befähigt (White und Wu 1973, Tucek 1982).

#### **3.1.2.1 Immunhistochemischer Nachweis der ChAT und der CarAT**

Mittels Immunfluoreszenzmarkierung konnte sowohl eine Expression der ChAT als auch der CarAT im Kolonepithel nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 3.6 (obere Reihe) zu erkennen ist, wird die Cholinacetyltransferase von den Kolonepithelzellen exprimiert. Die Intensität des ChAT-Fluoreszenzsignals ist im Oberflächenepithel und im oberen Kryptendrittel am stärksten ausgeprägt.

Auch die Carnitinacetyltransferase ist mittels Immunhistochemie im Kolonepithel nachweisbar (siehe Abb. 3.6 untere Reihe). Das CarAT-Fluoreszenzsignal ist ebenfalls hauptsächlich im Oberflächenepithel und im oberen Kryptendrittel zu finden.

Die Negativkontrollen, die nach demselben Protokoll jedoch ohne den Primärantikörper angefertigt wurden, zeigten keine Immunoreaktivität, sodass eine unspezifische Bindung des verwendeten Sekundärantikörpers ausgeschlossen werden konnte (nicht abgebildet).



**Abb. 3.6: Immunfluoreszenzmarkierung der ChAT und der CarAT**

*Obere Reihe:* Markierung der ChAT. *Untere Reihe:* Markierung der CarAT.

Orientierung im Gewebe für jedes Bild: *Oberer Bildteil:* Tunica mucosa mit den Krypten, *Unterer Bildteil:* Tunica submucosa und Tunica muscularis. *Linke Spalte:* DAPI-Kernfärbung (blau). *Mittlere Spalte:* Cy3-Aufnahme für ChAT bzw. CarAT (rot). *Rechte Spalte:* Überlagerungsaufnahme beider Färbungen. Eichbalken = 50  $\mu\text{m}$ . Die Abbildungen zeigen jeweils ein typisches Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

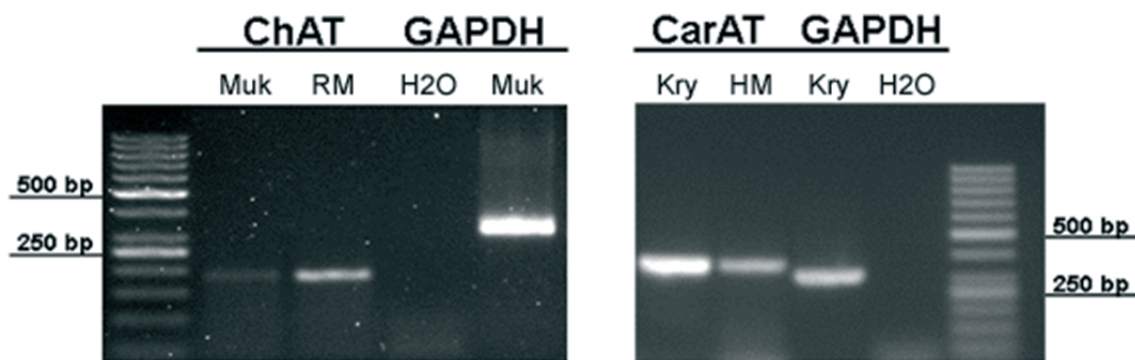
### 3.1.2.2 Molekularbiologischer Nachweis der ChAT und der CarAT

Um die mittels Immunfluoreszenz nachgewiesene Expression der ChAT und der CarAT auf mRNA-Ebene zu bestätigen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Die für den Nachweis der ChAT verwendete RNA wurde aus Kolonmukosa gewonnen (siehe Kap. 2.8.3), für den Nachweis der CarAT-mRNA wurde RNA aus isolierten Krypten verwendet (siehe Kap. 2.8.2). Als Referenzgewebe für die ChAT diente Rückenmark der Ratte, für die CarAT Herzmuskel der Ratte. Die Sequenzen der verwendeten Primerpaare und die entsprechenden Quellen können Tabelle 2.6 entnommen werden. Kontrollversuche wurden mit GAPDH und RNase-freiem Wasser angesetzt.

Abbildung 3.7 zeigt, dass sowohl die ChAT als auch die CarAT im Kolonepithel auf mRNA-Ebene nachweisbar ist. Allerdings konnte die ChAT-mRNA nicht in RNA aus isolierten Krypten nachgewiesen werden. Wurde jedoch RNA aus Kolonmukosa



verwendet, so war eine schwache Bande detektierbar (zu den möglichen Gründen siehe Diskussion). Die Größe der Amplifikate des entsprechenden Referenzgewebes und der Kolonmukosa (ChAT) bzw. Kolonkrypten (CarAT) stimmen überein und entsprechen der erwarteten Produktlänge von 183 bp (ChAT) bzw. 352 bp (CarAT). GAPDH (303 bp) diente als interne Kontrolle der Qualität der PCR-Reaktion (Abb. 3.7). In der Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O anstelle cDNA wurde wie gefordert, kein Produkt amplifiziert.



**Abb. 3.7: Agarosegele mit den PCR-Produkten für ChAT und CarAT**

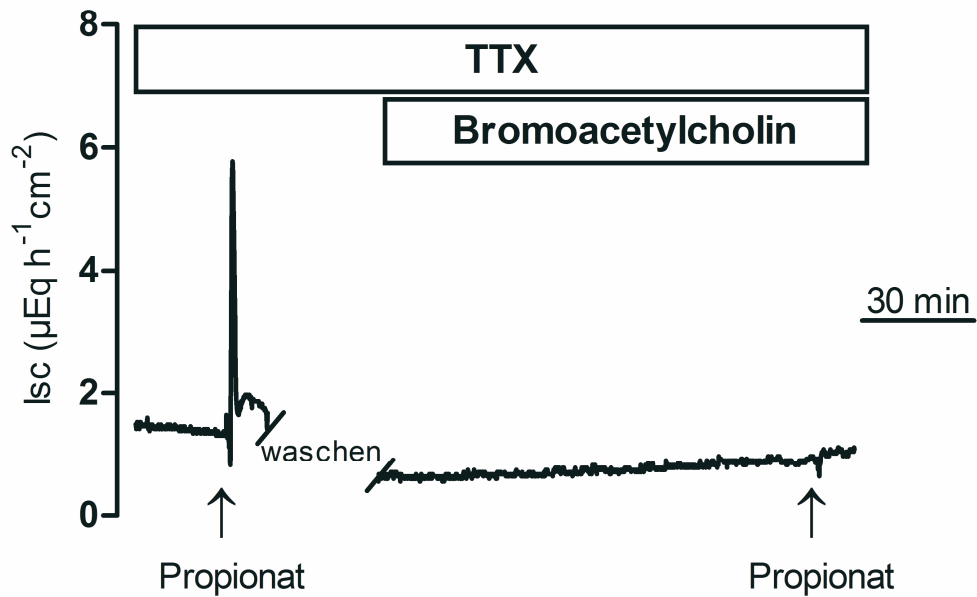
Die Agarosegele zeigen die Amplifikate für die Cholinacetyltransferase (ChAT, 183 bp) und die Carnitinacetyltransferase (CarAT, 352 bp). Die niedermolekularen PCR-Produkte stellen Primerdimere dar.

Muk = Kolonmukosa, RM = Rückenmark, Kry = isolierte Kolonkrypten, HM = Herzmuskel, H<sub>2</sub>O = Wasserkontrolle ohne Einsatz von cDNA. Die Abbildung zeigt ein typisches Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

#### **3.1.2.3 Untersuchung der Bedeutung der ChAT und der CarAT für die epitheliale Acetylcholinsynthese mittels Ussingkammer-Versuche**

Um die funktionelle Bedeutung der beiden Enzyme für die Acetylcholinsynthese in den Kolonepithelzellen der Ratte zu klären, wurden Ussingkammer-Versuche mit spezifischen Inhibitoren durchgeführt. Es wurde wiederum das Depletions-Protokoll (siehe Abb. 3.3 und Kap. 3.1.1.3) verwendet. Alle Versuche wurden in Anwesenheit von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) durchgeführt. Wurde Bromoacetylcholin, ein Inhibitor der ChAT (Tucek 1982) in einer Konzentration von  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l (auf serosaler Seite) eingesetzt, so wurde der durch Propionat induzierte Anstieg des  $I_{sc}$  signifikant gehemmt. Abbildung 3.8 zeigt einen Original-Kurvenverlauf der Ussingkammer-Versuche nach dem Depletions-Protokoll. Die erste Propionat-Applikation in Abwesenheit von Bromoacetylcholin resultierte in einem transienten Anstieg des  $I_{sc}$  von  $4,21 \pm 0,86 \mu\text{Eq/h} \cdot \text{cm}^2$  ( $n = 7$ , siehe Abb. 3.8 und Tab. 3.2), wohingegen die zweite Zugabe von Propionat nach zweistündiger Inkubation mit Bromoacetylcholin lediglich einen marginalen Anstieg des  $I_{sc}$  von  $0,54 \pm 0,23 \mu\text{Eq/h} \cdot \text{cm}^2$  ( $n = 7$ , siehe Abb. 3.8 und Tab. 3.2) zur Folge hatte. Dies lässt den Schluss zu, dass die Blockade der ChAT die Resynthese von Acetylcholin in den Kolonepithelzellen hemmt. Die Antwort auf Carbachol ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l auf serosaler Seite) wurde durch Bromoacetylcholin nicht negativ beeinflusst, wodurch eine unspezifische Hemmung von Acetylcholinrezeptoren ausgeschlossen werden konnte (siehe Tab. 3.2). Auch die Forskolin-Antwort blieb durch den Inhibitor unbeeinflusst. Im Gegensatz dazu hatte Mildronat ( $10^{-4}$  mol/l auf der serosalen Seite), ein Inhibitor der CarAT (Jaudzems et al. 2009), keinerlei hemmenden Effekt auf den Anstieg des  $I_{sc}$  nach der Zugabe von Propionat (siehe Abb. 3.9 und Tab. 3.2).

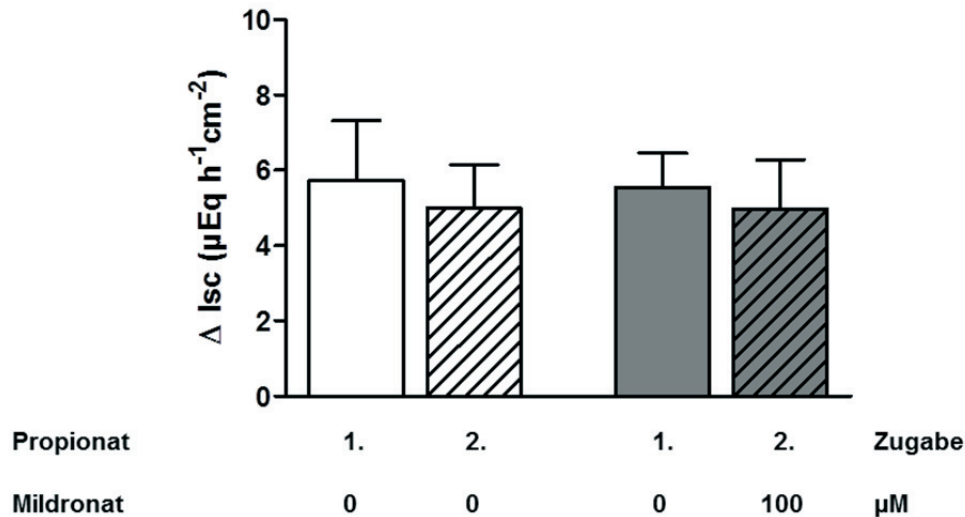
Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die ChAT für die Acetylcholinsynthese in den Kolonepithelzellen verantwortlich ist und die CarAT hierfür wohl keine Rolle spielt.



**Abb. 3.8: Original-Kurvenverlauf der Ussingkammer-Versuche mit Bromoacetylcholin**

Die erste Propionatzugabe ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l, mukosal) hatte einen starken, transienten Anstieg des  $I_{sc}$  zur Folge. Nach Inkubation mit Bromoacetylcholin ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l, serosal) für 120 min wurde erneut Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l, mukosal) appliziert, was jedoch keinen Anstieg des  $I_{sc}$  mehr bewirkte. Der Versuch wurde in Anwesenheit von Tetrodotoxin (TTX,  $10^{-6}$  mol/l, serosal) durchgeführt.

Die Grafik zeigt einen Original-Kurvenverlauf eines Ussingkammer-Versuches, die schrägen Striche zeigen an, dass Daten aus Gründen der Übersichtlichkeit ausgeblendet wurden. Statistik und Vitalitätskontrollen mit Carbachol und Forskolin siehe Tabelle 3.2.



**Abb. 3.9: Effekt der Blockade der CarAT auf den I<sub>sc</sub> am Kolonepithel**

Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l, mukosal) wurde zunächst unter Kontrollbedingungen appliziert, d. h. in Abwesenheit des Inhibitors (1. Zugabe) und dann nochmals in Abwesenheit oder Anwesenheit von Mildronat ( $10^{-4}$  mol/l, serosal; 2. Zugabe). Die weißen Balken stehen für die Kontrollen ohne Inhibitor, die grauen Balken für die Versuche mit Mildronat. Die gestrichelten Balken zeigen jeweils die zweite Zugabe von Propionat. Alle Versuche wurden in Anwesenheit von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) durchgeführt. Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg des I<sub>sc</sub> ( $\Delta I_{sc}$ ) im Vergleich zu einer über 3 min gemessenen Baseline direkt vor der jeweiligen Applikation dar. Die vertikalen Linien stehen für den SEM; n = 6 - 7.

**Tab. 3.2: Effekt der Blockade der ChAT und der CarAT auf den I<sub>sc</sub> am Kolonepithel**

Inhibitor	1. Propionat-Zugabe (- Inhibitor)	2. Propionat-Zugabe (± Inhibitor)	Carbachol	Forskolin	n
$\Delta I_{sc} (\mu\text{Eq/h} \cdot \text{cm}^2)$					
- Bromoacetylcholin	$3,67 \pm 0,73$	$4,10 \pm 1,16$	$4,25 \pm 0,48$	$5,10 \pm 1,15$	6
+ Bromoacetylcholin	$4,21 \pm 0,86$	$0,54 \pm 0,23 *$	$3,68 \pm 1,12$	$5,28 \pm 2,30$	7
- Mildronat	$5,73 \pm 1,60$	$5,00 \pm 1,16$	$6,15 \pm 0,82$	$3,61 \pm 0,36$	7
+ Mildronat	$5,55 \pm 0,91$	$4,98 \pm 1,30$	$6,53 \pm 1,34$	$4,69 \pm 0,85$	6

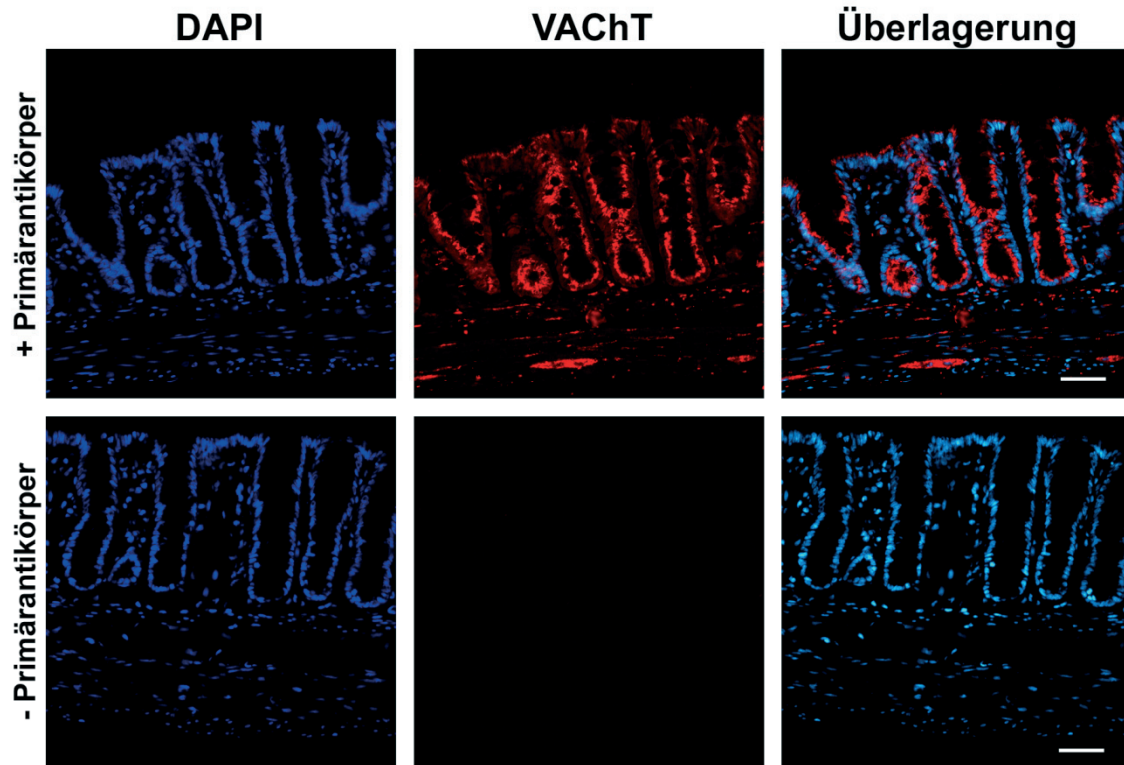
Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l, mukosal) wurde zunächst unter Kontrollbedingungen appliziert, d. h. in Abwesenheit des Inhibitors und dann nochmals in Abwesenheit oder Anwesenheit der entsprechenden Inhibitoren. Am Ende des Experiments wurde zunächst Carbachol ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l, serosal) und nach Erreichen der Baseline Forskolin ( $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l, serosal) zugegeben. Es wurden folgende Inhibitoren eingesetzt: Bromoacetylcholin (Inhibitor der ChAT,  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l, serosal), Mildronat (Inhibitor der CarAT,  $10^{-4}$  mol/l, serosal). Alle Versuche wurden in Anwesenheit von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) durchgeführt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* P < 0.05 versus  $\Delta I_{sc}$  der ersten Propionat-Zugabe.

### **3.1.3 Speicherung von Acetylcholin in Kolonepithelzellen**

In Neuronen wird Acetylcholin nach der Synthese über den vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT) in synaptische Vesikel transportiert und dort bis zu dessen exozytotischer Freisetzung gespeichert (Schäfer et al. 1994).

#### **3.1.3.1 Immunhistochemischer Nachweis des VACHT**

Mittels Immunhistochemie konnte die Expression des vesikulären Acetylcholintransporters (VACHT) im Kolonepithel nachgewiesen werden (Abb. 3.10, obere Reihe). Das Fluoreszenzsignal ist in der Epithelschicht entlang der gesamten Kryptenachse zu erkennen, jedoch besonders ausgeprägt im mittleren Bereich und in der Fundusregion der Krypten. Eine VACHT-Immunoreaktivität war auch im Bereich der Muscularis propria in Ganglien des Plexus myentericus zu sehen. Die Negativkontrollen, die nach demselben Protokoll jedoch ohne den Primärantikörper angefertigt wurden, zeigten keine Immunoreaktivität, sodass eine unspezifische Bindung des verwendeten Sekundärantikörpers ausgeschlossen werden kann (siehe Abb. 3.10, untere Reihe).



**Abb. 3.10: Immunfluoreszenzmarkierung des VACHT am distalen Kolon der Ratte**

*Obere Reihe:* Markierung des VACHT. *Untere Reihe:* Negativkontrolle.

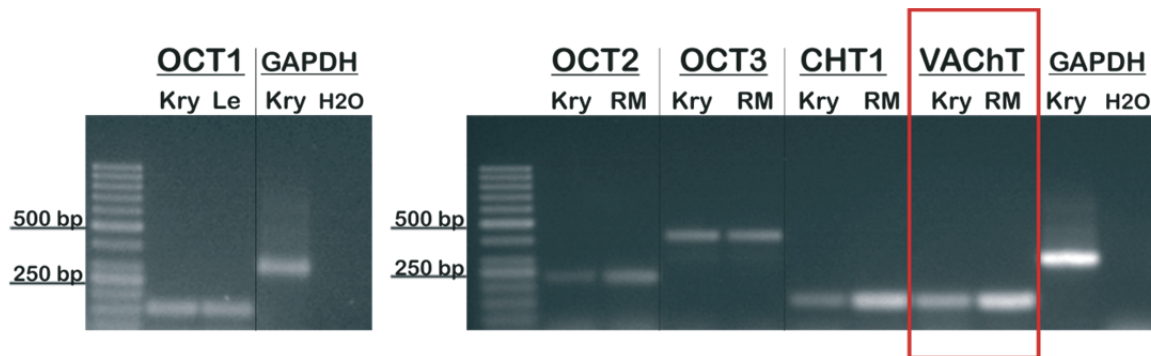
Orientierung im Gewebe für jedes Bild: *Oberer Bildteil:* Tunica mucosa mit den Krypten, *Unterer Bildteil:* Tunica submucosa und Tunica muscularis. *Linke Spalte:* DAPI-Kernfärbung (blau). *Mittlere Spalte:* Cy3-Aufnahme für VACHT (rot). *Rechte Spalte:* Überlagerungsaufnahme beider Färbungen. Eichbalken = 50  $\mu\text{m}$ . Die Abbildung zeigt ein typisches Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

### 3.1.3.2 Molekularbiologischer Nachweis des VACHT

Es wurde eine RT-PCR durchgeführt, um die Expression des VACHT im Kolonepithel auf mRNA-Ebene zu bestätigen. Die hierfür verwendete RNA wurde aus isolierten Kolonkrypten gewonnen (siehe Kap. 2.8.2). Als Referenzgewebe für den VACHT diente Rückenmark der Ratte. Die Sequenz des verwendeten Primerpaares und die entsprechende Quelle kann Tabelle 2.6 entnommen werden.

Als Positivkontrolle für die Effizienz der PCR-Reaktion wurde ein Primerpaar für das Housekeeping-Gen GAPDH eingesetzt. Um eine Verunreinigung des verwendeten RNase-freien Wassers mit genomischer DNA auszuschließen wurden je Versuchstag eine PCR-Reaktion mit RNase-freiem Wasser anstelle der cDNA als Negativkontrolle (jeweils mit dem Primerpaar für GAPDH) mitgeführt.

Abbildung 3.11 zeigt, dass der VACHT im Kolonepithel auch auf mRNA-Ebene nachweisbar ist. Die Größe der Amplifikate von Referenzgewebe und Kolonkrypten stimmen überein und entsprechen der erwarteten Produktlänge von 148 bp. GAPDH (303 bp) diente als interne Kontrolle der Qualität der PCR-Reaktion. In der Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O anstelle cDNA wurde wie gefordert kein Produkt amplifiziert.

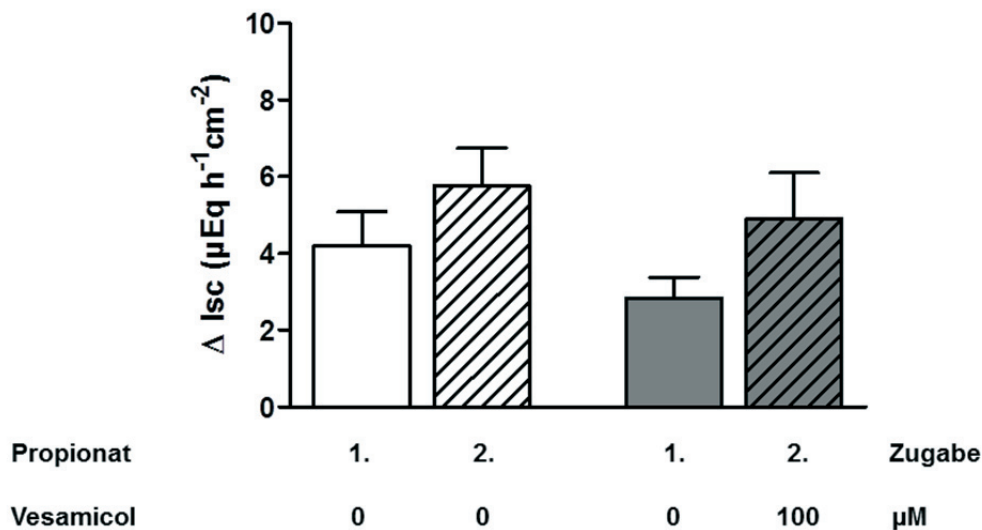


**Abb. 3.11: Agarosegele mit den PCR-Produkten für OCT1 - 3, CHT1 und VACHT**

Die Agarosegele zeigen die Amplifikate für die organischen Kationentransporter (OCT1 – 3), für den hochaffinen Cholintransporter (CHT1) und den vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT). Die niedermolekularen PCR-Produkte stellen Primerdimere dar. *Kry* = isolierte Kolonkrypten, *Le* = Leber, *RM* = Rückenmark, *H2O* = Wasserkontrolle ohne Einsatz von cDNA. Die Abbildung zeigt ein typisches Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. Die hier gezeigten Agarosegele entsprechen denen aus Abbildung 3.2.

### 3.1.3.3 Untersuchung der Bedeutung des VACHT für die Speicherung von epitheliale Acetylcholin mithilfe von Ussingkammer-Versuchen

Um die Frage zu klären, inwiefern der VACHT von funktioneller Bedeutung für die Speicherung (und Freisetzung) von Acetylcholin im Kolonepithel der Ratte ist, wurden Ussingkammer-Versuche nach dem Depletions-Protokoll (siehe Abb. 3.3) durchgeführt. Vesamicol ( $10^{-4}$  mol/l, auf der serosalen Seite), ein Inhibitor des VACHT (Wessler et al. 2001), hatte keinerlei hemmenden Effekt auf den durch Propionat induzierten Anstieg des  $I_{sc}$  (Abb. 3.12 und Tab. 3.3). Dies legt den Schluss nahe, dass der VACHT keine funktionelle Rolle am Kolonepithel spielt (siehe Diskussion).



**Abb. 3.12: Effekt der Blockade des VACHT auf den  $I_{sc}$  nach Zugabe von Propionat**

Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l, mukosal) wurde zunächst unter Kontrollbedingungen appliziert, d. h. in Abwesenheit des Inhibitors (1. Zugabe) und dann nochmals in Abwesenheit oder Anwesenheit von Vesamicol ( $10^{-4}$  mol/l, serosal; 2. Zugabe). Die weißen Balken stehen für die Kontrollen ohne Inhibitor, die grauen Balken für die Versuche mit Vesamicol. Die gestrichelten Balken zeigen jeweils die zweite Zugabe von Propionat. Alle Versuche wurden in Anwesenheit von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) durchgeführt. Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg des  $I_{sc}$  ( $\Delta I_{sc}$ ) im Vergleich zu einer über 3 min gemessenen Baseline direkt vor der jeweiligen Applikation dar. Die vertikalen Linien stehen für den SEM;  $n = 6 - 7$ . Statistik und Vitalitätskontrollen mit Carbachol und Forskolin siehe Tabelle 3.3.



**Tab. 3.3: Effekt der Blockade des VACHT auf den  $I_{sc}$  am Kolonepithel**

Inhibitor	1. Propionat-Zugabe (- Inhibitor)	2. Propionat-Zugabe ( $\pm$ Inhibitor)	Carbachol	Forskolin	n
	$\Delta I_{sc}$ ( $\mu\text{Eq/h}\cdot\text{cm}^2$ )				
– Vesamicol	$4,19 \pm 0,89$	$5,77 \pm 0,97$	$10,01 \pm 1,90$	$5,45 \pm 0,77$	6
+ Vesamicol	$2,83 \pm 0,56$	$4,89 \pm 1,21$	$7,61 \pm 1,17$	$4,92 \pm 0,97$	7

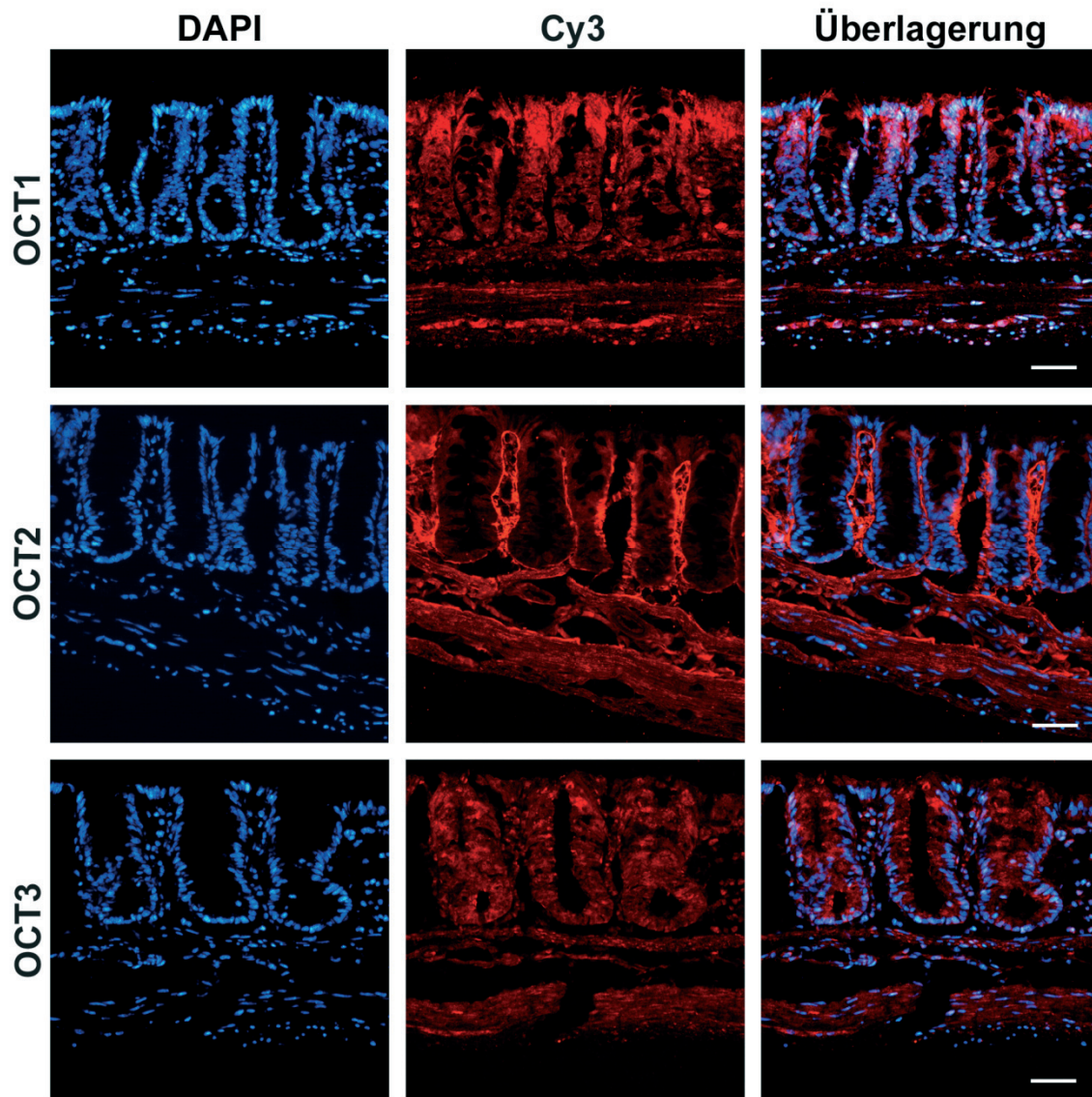
Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l, mukosal) wurde zunächst unter Kontrollbedingungen appliziert, d. h. in Abwesenheit des Inhibitors und dann nochmals in Abwesenheit oder Anwesenheit von Vesamicol ( $10^{-4}$  mol/l, serosal). Am Ende des Experiments wurde zunächst Carbachol ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l, serosal) und nach Erreichen der Baseline Forskolin ( $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l, serosal) zugegeben. Alle Versuche wurden in Anwesenheit von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) durchgeführt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### **3.1.4 Acetylcholinfreisetzung aus dem Kolonepithel**

Wie bereits erwähnt, wird die Acetylcholinfreisetzung aus Neuronen durch den VACHT vermittelt. Wie in Kapitel 3.1.3 gezeigt, wird dieser Transporter zwar im Kolonepithel exprimiert, ohne jedoch von funktioneller Bedeutung für die Speicherung und Freisetzung zu sein. Es wird jedoch diskutiert, dass die Freisetzung von Acetylcholin aus nicht-neuronalen Zellen über organische Kationentransporter (OCTs) erfolgt. Dieser Transportmechanismus ist u. a. für die Plazenta beschrieben (Wessler et al. 2001).

#### **3.1.4.1 Immunhistochemischer Nachweis der OCTs**

Anhand von Immunfluoreszenzmarkierungen konnte die Expression der drei Isoformen der organischen Kationentransporter (OCT1, OCT2, OCT3) im Kolonepithel nachgewiesen werden (Abb. 3.13). Das Fluoreszenzsignal für den OCT1 ist im Oberflächenepithel am stärksten ausgeprägt (siehe Abb. 3.13, obere Reihe). Das Signal für den OCT2 findet sich im basolateralen Bereich der Kolonepithelzelle entlang der gesamten Kryptenachse, jedoch nicht im Oberflächenepithel (siehe Abb. 3.13, mittlere Reihe). Das Fluoreszenzsignal für den OCT3 findet man in der Epithelschicht ohne erkennbaren Gradienten entlang der gesamten Kryptenachse (siehe Abb. 3.13, untere Reihe). Eine Immunoreaktivität war für alle OCT Isoformen auch im Bereich der Muscularis propria zu sehen. Die Negativkontrollen, die nach demselben Protokoll jedoch ohne den Primärantikörper angefertigt wurden, zeigten keine Immunoreaktivität, sodass eine unspezifische Bindung des verwendeten Sekundärantikörpers ausgeschlossen werden konnte (nicht abgebildet).



**Abb. 3.13.: Immunfluoreszenzmarkierung der OCTs am distalen Kolon der Ratte**

*Obere Reihe:* Markierung des OCT1. *Mittlere Reihe:* Markierung des OCT2. *Untere Reihe:* Markierung des OCT3.

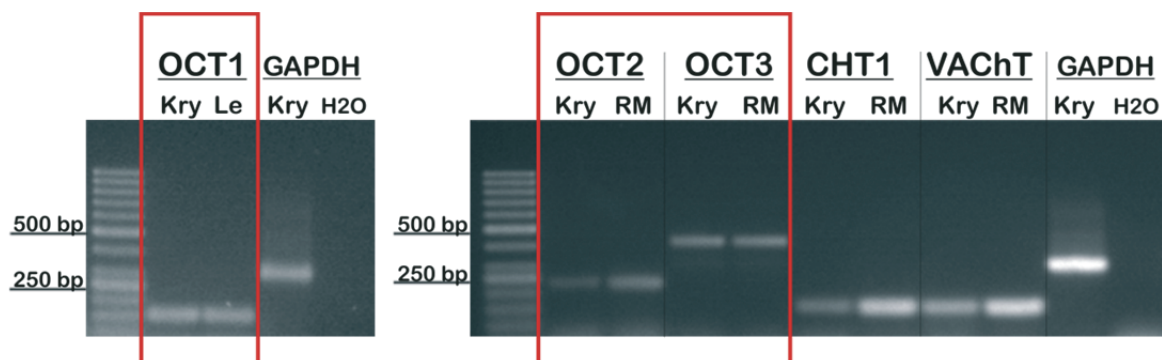
Orientierung im Gewebe für jedes Bild: *Oberer Bildteil:* Tunica mucosa mit den Krypten, *Unterer Bildteil:* Tunica submucosa und Tunica muscularis. *Linke Spalte:* DAPI-Kernfärbung (blau). *Mittlere Spalte:* Cy3-Aufnahme für OCTs (rot). *Rechte Spalte:* Überlagerungsaufnahme beider Färbungen. Eichbalken = 50  $\mu\text{m}$ . Die Abbildungen zeigen jeweils ein typisches Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

### 3.1.4.2 Molekularbiologischer Nachweis der OCTs

Um die Expression der drei OCT Isoformen im Kolonepithel auf mRNA-Ebene zu bestätigen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Die hierfür verwendete RNA wurde aus isolierten Kolonkrypten gewonnen (siehe Kap. 2.8.2). Als Referenzgewebe für den OCT1 diene Leber der Ratte, für den OCT2 und den OCT3 Rückenmark der Ratte. Die Sequenzen der verwendeten Primerpaare und die entsprechenden Quellen können Tabelle 2.6 entnommen werden.

Als Positivkontrolle für die Effizienz der PCR-Reaktion wurde ein Primerpaar für das Housekeeping-Gen GAPDH eingesetzt. Um eine Verunreinigung des verwendeten RNase-freien Wassers mit genomischer DNA auszuschließen wurden je Versuchstag eine PCR-Reaktion mit RNase-freiem Wasser anstelle der cDNA als Negativkontrolle (jeweils mit dem Primerpaar für GAPDH) mitgeführt.

Abbildung 3.14 zeigt, dass OCT1, OCT2 und OCT3 im Kolonepithel auch auf mRNA-Ebene nachweisbar sind. Die Größe der Amplifikate von Referenzgewebe und Kolonkrypten stimmen jeweils überein und entsprechen den erwarteten Produktlängen von 151 bp (OCT1), 226 bp (OCT2) und 421 bp (OCT3). GAPDH (303 bp) diene als interne Kontrolle der Qualität der PCR-Reaktion. In der Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O anstelle cDNA, wurde wie gefordert kein Produkt amplifiziert.



**Abb. 3.14: Agarosegele mit den PCR-Produkten für OCT1 - 3, CHT1 und VACHT**

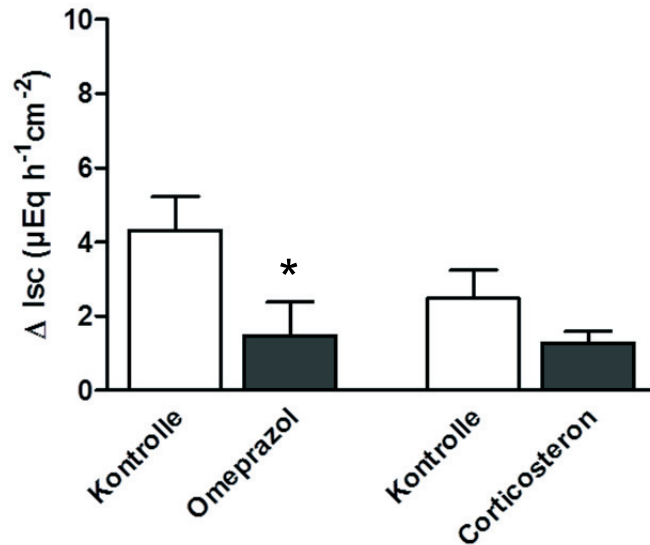
Die Agarosegele zeigen die Amplifikate für die organischen Kationentransporter (OCT1 – 3), für den hochaffinen Cholintransporter (CHT1) und den vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT). Die niedermolekularen PCR-Produkte stellen Primerdimere dar. *Kry* = isolierte Kolonkrypten, *Le* = Leber, *RM* = Rückenmark, *H2O* = Wasserkontrolle ohne Einsatz von cDNA. Die Abbildung zeigt ein typisches Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. Die hier gezeigten Agarosegele entsprechen denen aus Abbildung 3.2.

#### **3.1.4.3 Untersuchung der Bedeutung der OCTs für die Freisetzung des epithelialen Acetylcholins mithilfe von Ussingkammer-Versuchen**

Um die funktionelle Bedeutung der OCTs für die Acetylcholinfreisetzung zu untersuchen, wurden Ussingkammer-Versuche an Kolonmukosa-Präparaten durchgeführt. Prinzipiell war der Versuchsaufbau derselbe wie bei dem bisher verwendeten Depletions-Protokoll mit dem einzigen Unterschied, dass auf die erste Propionat-Zugabe verzichtet wurde. Diese war nicht nötig, da für eine Untersuchung der Mechanismen der Acetylcholinfreisetzung die intrazellulären Speicher nicht vorentleert werden mussten.

Als Inhibitoren der OCTs wurden in drei Versuchsreihen Corticosteron ( $10^{-4}$  mol/l, auf serosaler Seite), Omeprazol ( $10^{-5}$  mol/l, aktiviert durch HCl, auf der serosalen Seite) und beide in Kombination eingesetzt (Literatur zu den verwendeten Inhibitoren siehe: Wessler et al. 2001, Nies et al. 2011). In Gegenwart von Omeprazol war der durch Propionat induzierte Anstieg des  $I_{sc}$  signifikant gehemmt (siehe Abb. 3.15 und Tab. 3.4). Bei Blockade der OCTs durch Corticosteron war der Anstieg des  $I_{sc}$  etwa um die Hälfte vermindert, dieser Effekt erreichte aber keine Signifikanz (siehe Abb. 3.15 und Tab. 3.4). Der kombinierte Einsatz beider Inhibitoren bewirkte einen leicht additiven Effekt ihrer hemmenden Wirkung auf den Propionat-induzierten  $I_{sc}$  (siehe Tab. 3.4). Beim Einsatz dieser Inhibitor-Kombination war jedoch auch der  $I_{sc}$  nach Carbachol-Zugabe signifikant gehemmt (siehe Tab. 3.4), wobei die Forskolin-Antwort nicht negativ beeinflusst wurde, d. h. die Sekretionskapazität des Epithels war unvermindert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die OCTs für die Freisetzung von Acetylcholin aus Kolonepithelzellen verantwortlich sind.



**Abb. 3.15: Einfluss der Blockade der OCTs auf den Propionat-induzierten  $I_{sc}$ -Anstieg**

Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l, mukosal) wurde unter Kontrollbedingungen (d. h. in Abwesenheit des Inhibitors) oder in Anwesenheit von Omeprazol ( $10^{-5}$  mol/l, serosale Seite) bzw. Corticosteron ( $10^{-4}$  mol/l, serosal Seite) appliziert. Die weißen Balken stehen für die Kontrollen ohne Inhibitor, die grauen Balken für die Versuche mit den entsprechenden Inhibitoren. Alle Versuche wurden in Anwesenheit von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) durchgeführt. Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg des  $I_{sc}$  ( $\Delta I_{sc}$ ) im Vergleich zu einer über 3 min gemessenen Baseline direkt vor der Applikation dar. Die vertikalen Linien stehen für den SEM;  $n = 6 - 8$ . \*  $P < 0.05$  versus  $\Delta I_{sc}$  in Abwesenheit des entsprechenden Inhibitors. Statistik und Vitalitätskontrollen mit Carbachol und Forskolin siehe Tabelle 3.4.

**Tab. 3.4: Einfluss von Inhibitoren der OCTs auf den Propionat-induzierten  $I_{sc}$ -Anstieg**

Blocker	Propionat-Zugabe ± Inhibitor	Carbachol	Forskolin	n
	$\Delta I_{sc}$ ( $\mu\text{Eq/h}\cdot\text{cm}^2$ )			
– Omeprazol	$4,32 \pm 0,90$	$6,66 \pm 0,85$	$0,76 \pm 0,39$	7
+ Omeprazol	$1,48 \pm 0,91$ *	$7,63 \pm 1,68$	$1,37 \pm 0,78$	8
– Corticosteron	$2,49 \pm 0,76$	$5,23 \pm 0,26$	$4,18 \pm 0,56$	6
+ Corticosteron	$1,28 \pm 0,31$	$3,62 \pm 0,64$	$4,97 \pm 0,59$	7
– Omeprazol / Corticosteron	$4,27 \pm 0,45$	$6,67 \pm 0,87$	$3,34 \pm 0,75$	7
+ Omeprazol / Corticosteron	$1,30 \pm 0,29$ *	$3,34 \pm 0,60$ *	$6,23 \pm 0,98$	7

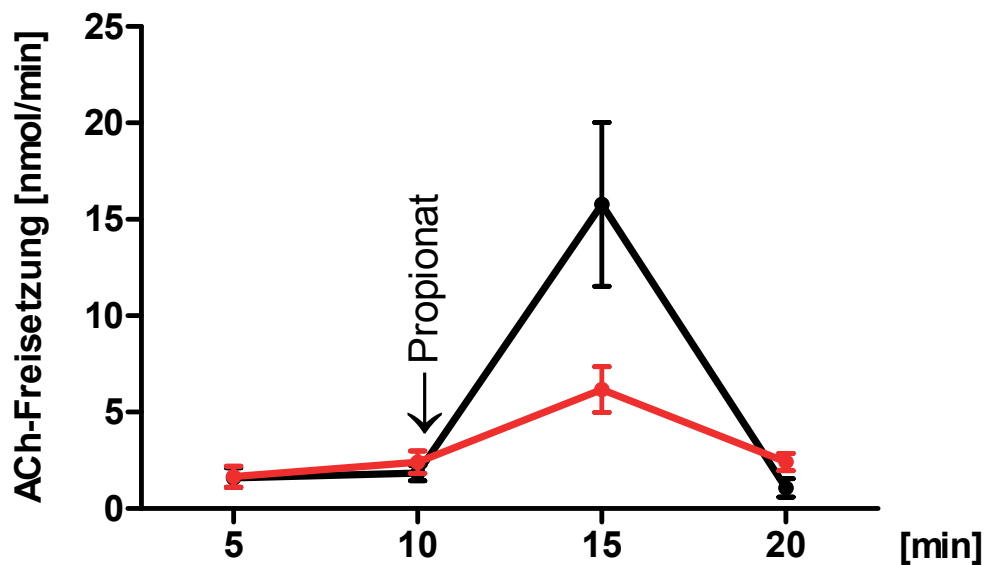
Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l, mukosale Seite) wurde unter Kontrollbedingungen (d. h. in Abwesenheit des Inhibitors) oder in Anwesenheit von Omeprazol ( $10^{-5}$  mol/l, serosale Seite) oder Corticosteron ( $10^{-4}$  mol/l, serosale Seite) oder beide in Kombination (Corticosteron  $10^{-4}$  mol/l, Omeprazol  $10^{-5}$  mol/l, serosale Seite) appliziert. Am Ende des Experiments wurde zunächst Carbachol ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l, serosal) und nach Erreichen der Baseline Forskolin ( $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l, mukosal und serosal) zugegeben. Alle Versuche wurden in Anwesenheit von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) durchgeführt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*  $P < 0.05$  versus  $\Delta I_{sc}$  in Abwesenheit der entsprechenden Substanz.

#### **3.1.4.4 Untersuchung der Bedeutung der OCTs für die Freisetzung des epithelialen Acetylcholins mithilfe von HPLC-Messungen**

Da die Kombination der beiden OCT-Inhibitoren Omeprazol und Corticosteron nicht nur den Propionat-induzierten  $I_{sc}$ -Anstieg, sondern auch die Carbachol-Antwort signifikant hemmte, wurde die tatsächlich freigesetzte Menge an Acetylcholin nach Stimulation mit Propionat an Mukosapräparaten bestimmt. Hierzu wurde eine HPLC-Analyse von Pufferproben im Labor von Prof. Dr. Jochen Klein (Institut für Pharmakologie, Universität Frankfurt) durchgeführt. Die Gewinnung der Pufferproben erfolgte im Prinzip wie in Kapitel 3.1.1.4 beschrieben mit dem Unterschied, dass die Mukosapräparate von Beginn an mit Omeprazol ( $10^{-5}$  mol/l, auf serosaler Seite) und Corticosteron ( $10^{-4}$  mol/l, serosaler Seite) inkubiert wurden und nur eine Applikation von Propionat erfolgte. Die Proben der Zeitpunkte  $t_0$  –  $t_{10}$  dienten der Messung der basal freigesetzten Menge an Acetylcholin aus dem Kolonepithel. Unmittelbar nach Entnahme der Probe  $t_{10}$  wurde Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l) auf der mukosalen Seite appliziert, was eine transiente Freisetzung epithelialen Acetylcholins stimulierte (siehe Abb. 3.16,  $t_{15}$  und  $t_{20}$ ). Unter Kontrollbedingungen (also ohne Inhibitor) betrug die basale Freisetzungsrate an Acetylcholin  $1,84 \pm 0,40$  nmol/min ( $n = 10$ ). Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l auf der mukosalen Seite) stimulierte einen starken Anstieg der Acetylcholinfreisetzung ( $15,8 \pm 4,25$  nmol/min). Eine Vorbehandlung der Mukosapräparate mit der Kombination aus Omeprazol und Corticosteron beeinflusste die basale Acetylcholinfreisetzung zwar nicht, da diese dennoch  $2,42 \pm 0,58$  nmol/min betrug. Die Freisetzungsrate von Acetylcholin nach Stimulation mit Propionat betrug jedoch nur  $6,18 \pm 1,19$  nmol/min, was einer signifikanten Hemmung der Acetylcholinfreisetzung gegenüber der Kontrollantwort (also in Abwesenheit der Inhibitoren) entspricht ( $P < 0,05$ , siehe Abb. 3.16). Die Versuche wurden in Anwesenheit von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) und Eserin ( $10^{-5}$  mol/l auf der serosalen Seite) durchgeführt.

Anhand dieser Messungen lässt sich sagen, dass die OCTs eine wichtige Rolle bei der Freisetzung von Acetylcholin aus den Kolonepithelzellen spielen.





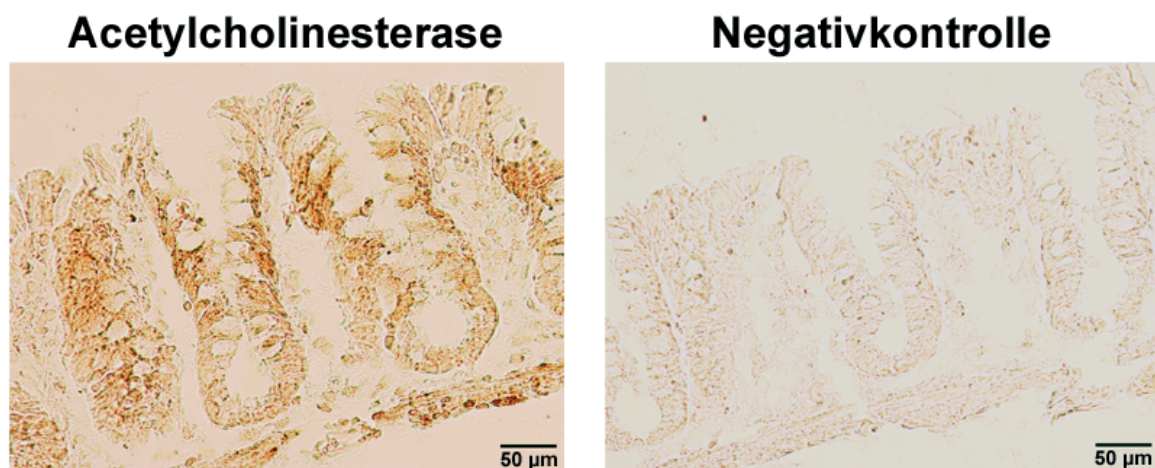
**Abb. 3.16: Propionat-induzierte Acetylcholinfreisetzung an Mukosapräparaten**

Die schwarze Linie zeigt die Acetylcholinfreisetzung in das basolaterale Kompartiment der Mukosapräparate unter Kontrollbedingungen. Nach mukosaler Applikation von Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l) stieg die Freisetzung transient an. Die rote Linie zeigt die freigesetzte Acetylcholin-Menge nach Prä-Inkubation des Gewebes mit den OCT-Inhibitoren Omeprazol ( $10^{-5}$  mol/l auf der serosalen Seite) und Corticosteron ( $10^{-4}$  mol/l auf der serosalen Seite). Bei Blockade der OCTs war die Acetylcholinfreisetzung signifikant vermindert gegenüber der Kontrolle ( $P < 0,05$ ,  $n = 10$ ). Die Versuche wurden in Anwesenheit von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) und Eserin ( $10^{-5}$  mol/l auf der serosalen Seite) durchgeführt.

#### 3.1.5 Nachweis der Esteraseaktivität im Kolonepithel

Um zu untersuchen, ob die Epithelzellen des distalen Kolons der Ratte selbst die Fähigkeit haben, Acetylcholin zu spalten, wurde eine enzymhistochemische Färbung nach Karnovsky und Roots (siehe Kap. 2.7) an Gewebeschnitten des Kolons durchgeführt.

Wie in Abbildung 3.17 zu erkennen ist, wird die Acetylcholinesterase in den Kolonepithelzellen exprimiert. Das Reaktionsprodukt (*Hatchett's brown*) ist entlang der gesamten Kryptenachse zu erkennen, besonders ausgeprägt im mittleren Abschnitt der Krypten. Eine intensive Esteraseaktivität war auch im Bereich der Muscularis propria zu sehen. Die Negativkontrollen, die nach demselben Protokoll, jedoch ohne Acetylthiocholin angefertigt wurden, zeigten keinerlei braunen Niederschlag, sodass eine unspezifische Reaktion des Inkubationsmediums mit dem Gewebe ausgeschlossen werden kann. Da (aufgrund der extremen Toxizität dieser Substanz) auf den Zusatz eines spezifischen Inhibitors der Butyrylcholinesterase (iso-OMPA; Koelle et al. 1974) zu dem Inkubationsmedium verzichtet wurde, kann nicht unterschieden werden, ob das Reaktionsprodukt durch eine Acetylcholinesterase- oder Butyrylcholinesterase-Aktivität zustande kommt.



**Abb. 3.17: Nachweis der Cholinesterasen am Kolonepithel der Ratte**

*Linke Seite:* Markierung der Acetylcholinesterase. *Rechte Seite:* Negativkontrolle.

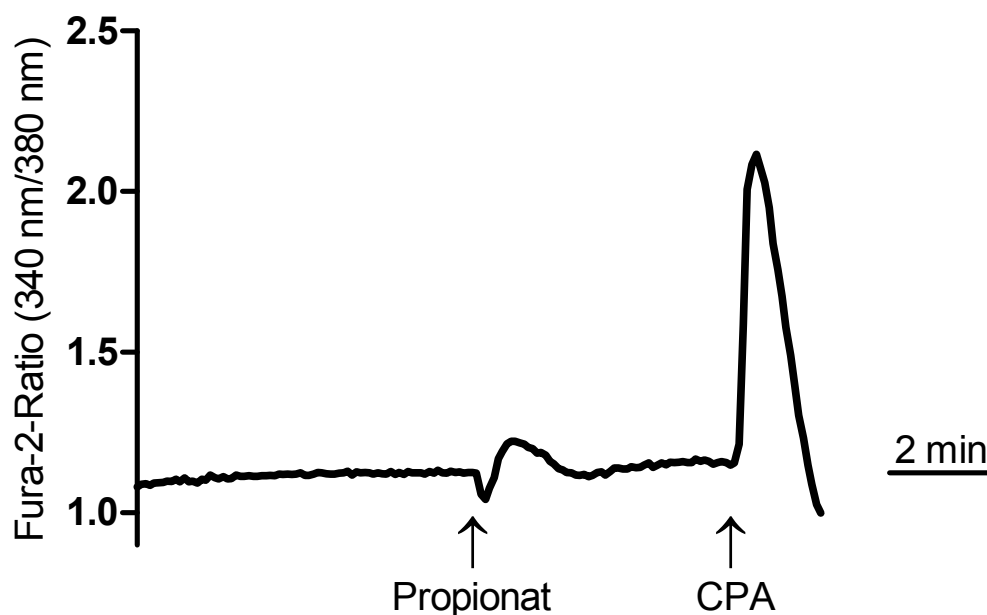
Abgebildet ist die Tunica mucosa mit den Krypten. Eichbalken = 50 µm. Die Abbildung zeigt ein typisches Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten

## 3.2 Signalübertragung des epithelialen Acetylcholins

### 3.2.1 Propionat bewirkt einen Anstieg der zytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in isolierten Krypten

Um zu überprüfen, ob eine Veränderung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration die Wirkung von Propionat bzw. dem auf diesen Stimulus hin freigesetzten epithelialen Acetylcholin vermittelt, wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -Imagingversuche (siehe Kap. 2.10.5) an isolierten Kolonkrypten (siehe Kap. 2.4.3) durchgeführt. Die Krypten wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 aufgeladen, mit dessen Hilfe Veränderungen der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration sichtbar gemacht werden können.

Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l) bewirkte eine biphasische Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (siehe Abb. 3.18). Zunächst kam es zu einem transienten Abfall der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gefolgt von einem transienten Anstieg.



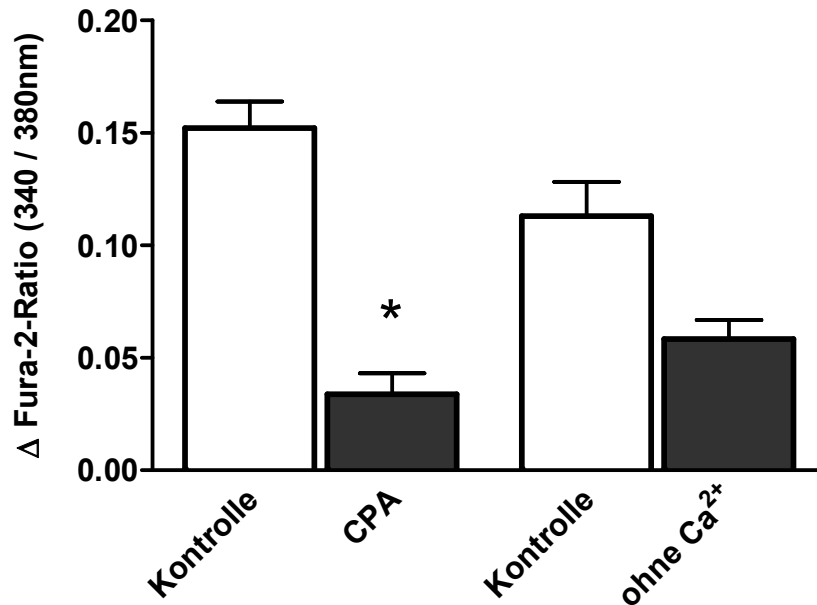
**Abb. 3.18: Veränderung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration durch Propionat**

Dargestellt ist ein Original-Kurvenverlauf einer Fura-2-Imaging-Messung an isolierten Krypten des Rattenkolons. Die Applikation von Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l) bewirkte zunächst einen kurzzeitigen Abfall der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, direkt gefolgt von einem Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Bereits 2 min nach der Applikation entsprach die Konzentration des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  wieder annähernd der Konzentration vor der Zugabe. Die Applikation von Cyclopiazonsäure (CPA,  $1,5 \cdot 10^{-5}$  mol/l) am Ende eines jeden Versuches diente als Vitalitätskontrolle.

Ein Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kann entweder durch einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellularraum oder durch eine Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern bedingt sein. Um zu untersuchen, welche der beiden Möglichkeiten für den Propionat-induzierten Anstieg des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  verantwortlich ist, wurde eine Versuchsreihe mit Cyclopiazonsäure, einem Inhibitor der sarkoplasmatischen-endoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, dem wichtigsten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportenzym zur Auffüllung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher (Goeger et al. 1988), und eine Versuchsreihe mit  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Pufferlösung durchgeführt.

Cyclopiazonsäure, welche zu einer Entleerung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher durch Hemmung der Wiederauffüllung führt, wurde in einer Konzentration von  $1,5 \cdot 10^{-5}$  mol/l eingesetzt. In Gegenwart von Cyclopiazonsäure war der Propionat-induzierte Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration signifikant vermindert ( $P < 0,05$ ,  $n = 69 - 72$ , siehe Abb. 3.19). Auch die Inkubation in einem  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Puffer führte zu einer Abschwächung der Propionat-Antwort. In diesem Fall war der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration um 48 % vermindert, diese Hemmung erreichte jedoch keine Signifikanz ( $n = 95 - 117$ , siehe Abb. 3.19).

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass der Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Applikation von Propionat vor allem auf einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern beruht und weniger stark von einem Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  abhängt.



**Abb. 3.19: Einfluss von intrazellulärem und extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  auf die Propionat-Antwort**

Bestimmung der  $\Delta\text{Fura-2-Ratio}$  an isolierten Krypten. Eine Prä-Inkubation der Krypten mit Cyclopiazonsäure (CPA;  $1,5 \cdot 10^{-5}$  mol/l) führte zu einer signifikanten Hemmung des Anstiegs der Fura-2-Ratio nach Applikation von Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l) gegenüber den unbehandelten Kontrollen ( $n = 69 - 72$ ). Auch die Verwendung einer  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Tyrode führte zu einer Verminderung des Propionat-induzierten Anstiegs der Fura-2-Ratio gegenüber den Kontrollen, die jedoch keine Signifikanz erreichte ( $n = 95 - 117$ ). Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg der Fura-2-Ratio ( $\Delta\text{Fura-2-Ratio}$ ) im Vergleich zu einer über 3 min gemessenen Baseline direkt vor der Propionat-Applikation dar, die vertikalen Striche symbolisieren den SEM. \* $P < 0,05$  versus der Kontrolle ohne Vorbehandlung.

In der Literatur sind muskarinerge Acetylcholinrezeptoren vom Typ M1 und M3 am Kolonepithel beschrieben (Khan et al. 2013). Über die Existenz von nikotinergen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) im Kolonepithel ist bisher wenig bekannt, obwohl einige Studien auf ihre Expression hindeuten. Beispielsweise konnten in HT29-Zellen, einer epithelialen Kolonkarzinom-Zelllinie des Menschen, einige nAChR-Untereinheiten nachgewiesen werden (Summers et al. 2003).

Um zu untersuchen, welcher Acetylcholinrezeptor-Typ an den Kolonepithelzellen der Ratte für die Antwort auf das epitheliale Acetylcholin verantwortlich ist, wurden wiederum  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging Versuche mit Fura-2 an isolierten Krypten durchgeführt. Es wurde erneut Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l) eingesetzt, um eine Acetylcholinfreisetzung aus dem Epithel zu induzieren.

Für das Kolonepithel ist ein massiver Gradient hinsichtlich der Zellreifung charakteristisch. Am Kryptenfundus befinden sich die jungen, proliferierenden Zellen. Im Verlaufe ihrer Entwicklung wandern diese Zellen entlang der Kryptenachse über die Mitte zur Oberfläche. Hierbei verändern die Zellen ihre Transporteigenschaften von zu Beginn vorherrschender Sekretion am Fundus der Krypte hin zu überwiegender Resorption im Bereich des Oberflächenepithels (Köckerling und Fromm 1993, Köckerling et al. 1993).

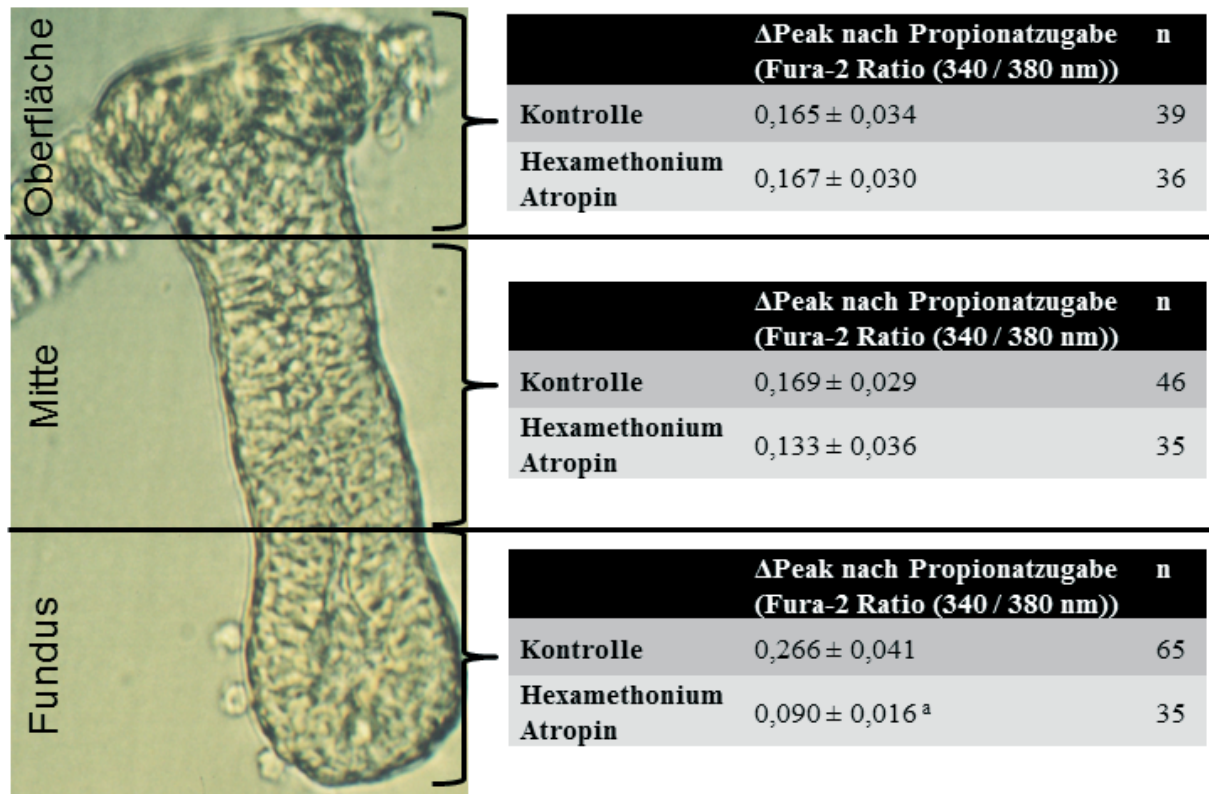
Daher stellte sich die Frage, ob die Epithelzellen der unterschiedlichen Kryptenbereiche unterschiedlich auf die Applikation von Propionat reagieren. Dazu wurden zunächst die Propionat-Antworten der Versuche mit den Acetylcholinrezeptor-Antagonisten Atropin und Hexamethonium (Starke 2001) nach den drei verschiedenen Kryptenabschnitten (Fundus, Mitte und Oberfläche) ausgewertet. Dabei ließ sich eine biphasische Veränderung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, also ein initialer Abfall gefolgt von einem transienten Anstieg des Fura-2-Ratio-Signals, in allen Etagen der Krypte beobachten, ohne dass ein eindeutiger Gradient in der Höhe der Antwort auszumachen war (Tab. 3.5). Der Differenzierungsgrad der Epithelzellen beeinflusst die Antwort auf Propionat also offenbar nicht. Eine Blockade der muskarinergen AChR mit Atropin ( $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l) und der nikotinergen AChR mittels Hexamethonium ( $10^{-4}$  mol/l) führte nur im Bereich der Kryptenoberfläche zu einer Hemmung der Propionat-Antwort. Die kombinierte Hemmung beider AChR-Typen führte jedoch zu einer signifikanten Hemmung der Propionat-Antwort im Fundusbereich der Krypte (Tab. 3.5). Diese Hemmung ist zur besseren Übersichtlichkeit nochmals grafisch in Abb. 3.20 dargestellt.

Dass der Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nur teilweise durch Antagonisten cholinergere Rezeptoren zu hemmen ist (Tab. 3.5), erklärt sich über die Art und Weise, wie kurzkettige Fettsäuren von Kolonepithelzellen erkannt werden. Die Rezeptoren für kurzkettige Fettsäuren, GPR41 und GPR43, sind typische  $\text{G}_q$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren (Yajima et al. 2011b), deren Stimulation daher selbst zu einem Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt, was wiederum die Antwort auf das parakrin freigesetzte Acetylcholin teilweise überdeckt. Dennoch zeigen diese Ergebnisse, dass das epitheliale Acetylcholin seine Wirkung sowohl über muskarinerge als auch nikotinerge Acetylcholinrezeptoren vermittelt.

**Tab. 3.5: Einfluss von Acetylcholinrezeptor-Antagonisten auf die Propionat-Antwort entlang der Kryptenachse**

Bedingungen	Δ Fura-2-Ratio (340 / 380 nm) nach Propionat-Zugabe		n
Oberfläche			
	Initialer Abfall	Peak	
- Atropin	-0,012 ± 0,017	0,136 ± 0,020	19
+ Atropin	-0,008 ± 0,009	0,090 ± 0,015	21
- Hexamethonium	-0,015 ± 0,013	0,120 ± 0,016	27
+ Hexamethonium	-0,011 ± 0,006	0,067 ± 0,010 *	31
- Hexamethonium/Atropin	-0,057 ± 0,014	0,165 ± 0,034	39
+ Hexamethonium/Atropin	-0,011 ± 0,012 *	0,167 ± 0,030	36
Mitte			
	Initialer Abfall	Peak	
- Atropin	-0,053 ± 0,021	0,112 ± 0,025	20
+ Atropin	-0,044 ± 0,013	0,118 ± 0,021	23
- Hexamethonium	-0,033 ± 0,018	0,090 ± 0,021	24
+ Hexamethonium	-0,013 ± 0,018	0,129 ± 0,023	34
- Hexamethonium/Atropin	-0,056 ± 0,012	0,169 ± 0,029	46
+ Hexamethonium/Atropin	-0,014 ± 0,013	0,133 ± 0,036	35
Fundus			
	Initialer Abfall	Peak	
- Atropin	-0,048 ± 0,021	0,063 ± 0,014	20
+ Atropin	-0,040 ± 0,013	0,088 ± 0,025	32
- Hexamethonium	-0,055 ± 0,015	0,079 ± 0,012	36
+ Hexamethonium	-0,023 ± 0,010	0,070 ± 0,018	32
- Hexamethonium/Atropin	-0,086 ± 0,017	0,266 ± 0,041	65
+ Hexamethonium/Atropin	-0,016 ± 0,006	0,090 ± 0,016 *	35

Bestimmung der  $\Delta$ Fura-2-Ratio aller Zellen entlang der Kryptenachse nach Applikation von Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l) unter Kontrollbedingungen und nach vorheriger Inkubation mit Atropin ( $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l), Hexamethonium ( $10^{-4}$  mol/l) oder beiden Inhibitoren in Kombination. Eine Blockade der muskarinergen AChR mit Atropin und der nikotinergen AChR mittels Hexamethonium führte nur im Bereich der Kryptenoberfläche zu einer Hemmung der Propionat-Antwort (n = 19 - 31). Die kombinierte Hemmung beider AChR-Typen führte jedoch zu einer signifikanten Hemmung der Propionat-Antwort im Fundusbereich der Krypte (n = 35 - 65). n = Anzahl gemessener ROIs. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* P < 0,05 im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe.



**Abb. 3.20: Vergleich der Propionat-Antwort der Kolonepithelzellen entlang der Kryptenachse**

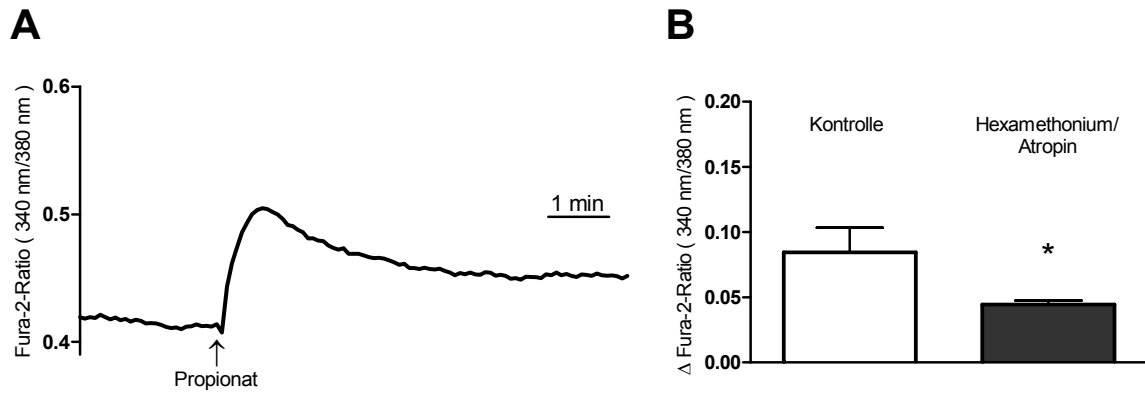
Bestimmung der  $\Delta\text{Fura-2-Ratio}$  der Zellen der drei Kryptenregionen Oberfläche, Mitte und Fundus nach Applikation von Propionat unter Kontrollbedingungen (d. h. ohne Inhibitor) und nach vorheriger Inkubation mit Atropin ( $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l) und Hexamethonium ( $10^{-4}$  mol/l). Der Anstieg der Fura-2-Ratio bedeutet einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. n = Anzahl gemessener ROIs. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. <sup>a</sup>  $P < 0,05$  im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe.



#### 3.2.1.1 $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Versuche mit HT29/B6-Zellen

Selbst bei der Verwendung isolierter Krypten kann eine Kontamination mit neuronalem Material nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden. Um die Propionat-induzierte Freisetzung von epithelialelem Acetylcholin aus Kolonepithelzellen und dem dadurch bedingten Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu bestätigen, wurden  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Versuche an HT29/B6-Zellen (siehe Kap. 2.5 und Kap. 2.10.5), einer humanen Kolonepithelzelllinie, durchgeführt. An HT29/B6-Zellen bewirkt Propionat einen biphasischen Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Innerhalb einer Minute nach der Applikation von Propionat stieg die Fura-2-Ratio auf ein Maximum an und fiel dann in der zweiten Phase wieder exponentiell ab (siehe Abb. 3.21 A). Im Unterschied zu den Messungen an den isolierten Kolonkrypten erreichte die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration 5 Minuten nach Zugabe von Propionat nicht das Niveau der Baseline, sondern die Fura-2-Ratio lag im Mittel noch  $0,033 \pm 0,003$  über der vorher ermittelten Baseline.

Um zu überprüfen, inwieweit dieser Anstieg von dem freigesetzten epithelialen Acetylcholin verursacht wird, wurden die Zellen mit den AChR-Antagonisten Atropin ( $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l) und Hexamethonium ( $10^{-4}$  mol/l) in Kombination vorbehandelt. Unter Kontrollbedingungen (d. h. ohne Inhibitor) führte die Applikation von Propionat zu einem Anstieg der Fura-2-Ratio von  $0,085 \pm 0,019$  im Vergleich zur vorher ermittelten Baseline ( $n = 99$ ). Nach der Vorbehandlung mit den oben genannten Inhibitoren führte Propionat zu einem Anstieg der Fura-2-Ratio von  $0,045 \pm 0,003$  im Vergleich zur Baseline ( $n = 133$ ). Dies entspricht einer signifikanten Hemmung des Anstiegs der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von 47 % (siehe Abb. 3.21 B). Folglich führt Propionat auch an HT29/B6-Zellen, also einer Kolonepithelzelllinie, zu einer Freisetzung von epithelialelem Acetylcholin, das dann para- bzw. autokrin durch Bindung an epitheliale cholinerge Rezeptoren zu einer Stimulation des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwegs führt.



**Abb. 3.21: Veränderung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch Propionat an HT29/B6-Zellen**

**A:** Dargestellt ist ein Original-Kurvenverlauf einer Fura-2-Imaging-Messung an HT29/B6-Zellen. Die Applikation von Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l) bewirkt einen raschen Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gefolgt von einem langsamen Abfall.

**B:** Bestimmung des maximalen Anstiegs der  $\Delta$ Fura-2-Ratio nach Applikation von Propionat ( $2 \cdot 10^{-3}$  mol/l) unter Kontrollbedingungen (ohne Inhibitor; weißer Balken) und nach vorheriger Inkubation mit Atropin ( $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l) und Hexamethonium ( $10^{-4}$  mol/l) in Kombination (dunkelgrauer Balken). Die kombinierte Hemmung beider AChR-Typen führte zu einer signifikanten Hemmung der Propionat-Antwort ( $n = 99 - 133$ ).  $n$  = Anzahl gemessener ROIs. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM und angegeben als Anstieg über die Baseline direkt vor der Zugabe von Propionat. \*  $P < 0,05$  im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe.

### **3.3 Nikotinerge Acetylcholinrezeptoren am Kolonepithel der Ratte**

Die Ergebnisse der  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Experimente (Kap. 3.2) legen den Schluss nahe, dass die Antwort der Kolonepithelzellen auf das non-neuronale Acetylcholin nicht allein durch muskarinerge AChR getragen wird, sondern auch durch nikotinerge AChR. In der Literatur sind lediglich die muskarinergen M1 und M3 Rezeptoren am Kolonepithel beschrieben (Diener et al. 1989a, Haberberger et al. 2006), für die nikotinergen Acetylcholinrezeptoren jedoch existiert keine vergleichbare Studie am Kolonepithel der Ratte.

#### **3.3.1 Molekularbiologischer Nachweis von Untereinheiten der nikotinergen Acetylcholinrezeptoren**

Um das Kolonepithel der Ratte auf die Expression von nikotinergen Acetylcholinrezeptoren zu untersuchen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Auf eine immunhistochemische Untersuchung wurde verzichtet, da der größte Teil der existierenden kommerziell verfügbaren Antikörper gegen Acetylcholinrezeptoren unspezifisch bindet (Jositsch et al. 2009, Weitz 2012).

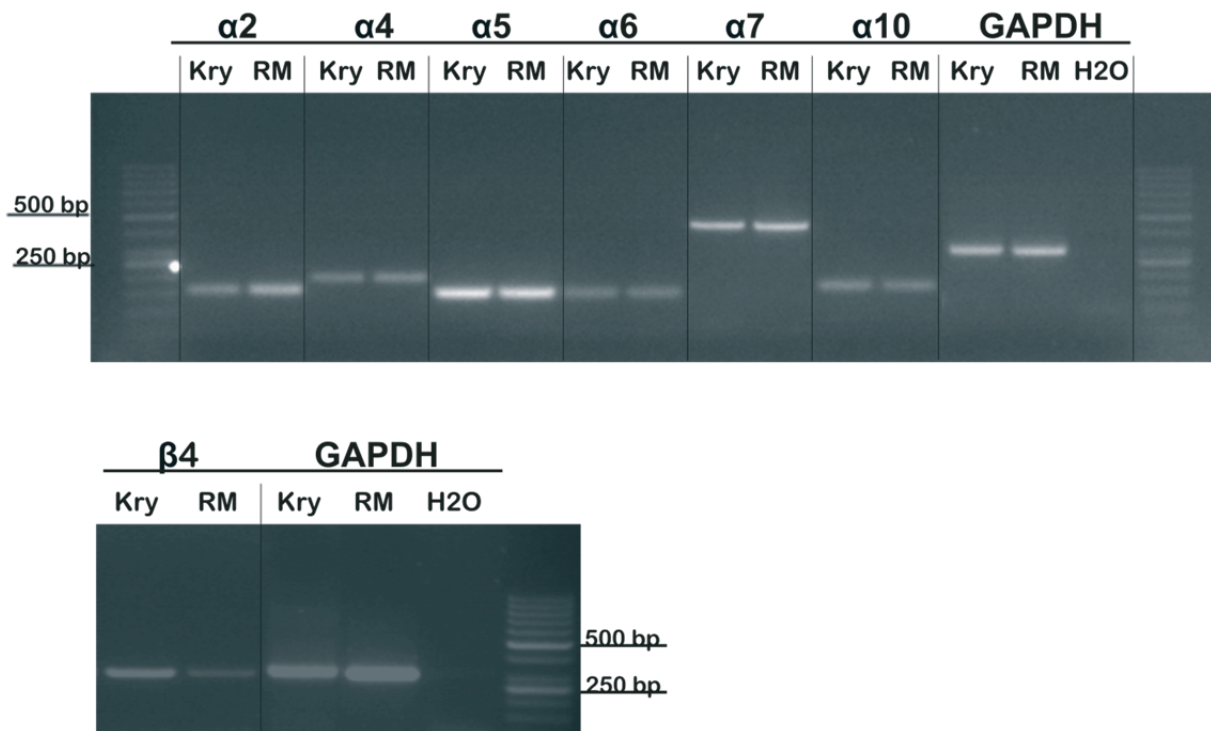
Die verwendete RNA wurde aus isolierten Kolonkrypten gewonnen (siehe Kap. 2.8.2) um eine Kontamination mit neuronalem Material zu vermeiden. Als Referenzgewebe für die  $\alpha 1$ - und  $\beta 1$ -Untereinheit diente Skelettmuskel der Ratte, für die restlichen Untereinheiten wurde Rückenmark der Ratte verwendet. Die Sequenzen der verwendeten Primerpaare und die entsprechenden Quellen können Tabelle 2.7 entnommen werden.

Kontrollversuche wurden - wie in den anderen PCR-Nachweisen - mit GAPDH und RNase-freiem Wasser angesetzt.

Es konnten folgende Untereinheiten nachgewiesen werden:  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 10$  und  $\beta 4$  (Abb. 3.22). Nicht im Kolonepithel, jedoch im Referenzgewebe nachweisbar waren die Untereinheiten  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 3$  (Daten nicht gezeigt). Für die  $\alpha 9$ -Untereinheit gelang weder ein Nachweis im Referenzgewebe noch im Kolonepithel. Mikulski (2010) beschreibt ebenfalls Probleme mit dem Nachweis der  $\alpha 9$ - Untereinheit und konnte diese nur nachweisen, wenn zur cDNA-Synthese das Superscript Kit II (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) verwendet wurde (für

die Diskussion möglicher Gründe siehe Mikulski 2010). Doch weder beim Einsatz von cDNA, die mithilfe dieses Kits hergestellt wurde (siehe Kap. 2.8.5) noch bei Verwendung verschiedener Primer (Glowatzki et al. 1995; Hecker et al. 2009, Mikulski et al. 2010, Schirmer et al. 2011) konnte die  $\alpha 9$ -Untereinheit von mir im Kolonepithel nachgewiesen werden.

Alle amplifizierten Gensequenzen konnten mittels Gelelektrophorese als einzelne Banden mit der erwarteten Produktgröße (siehe Tab. 2.7) detektiert werden. GAPDH (303 bp, siehe Tab. 2.6) diente als interne Kontrolle der Qualität der PCR-Reaktion. In der Negativkontrolle mit H<sub>2</sub>O anstelle cDNA, wurde wie gefordert kein Produkt amplifiziert.



**Abb. 3.22: Agarosegele mit den PCR-Produkten der Untereinheiten der nikotinergen Acetylcholinrezeptoren**

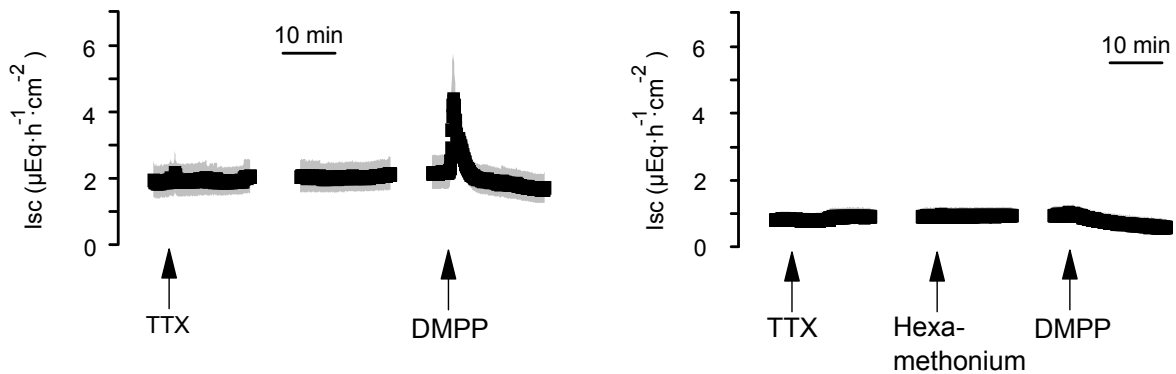
Die Agarosegele zeigen die Amplifikate für folgende Untereinheiten der nikotinergen ACh-Rezeptoren:  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 10$ ,  $\beta 4$ . Die niedermolekularen PCR-Produkte stellen Primerdimere dar. *Kry* = isolierte Kolonkrypten, *RM* = Rückenmark, *H2O* = Wasserkontrolle ohne Einsatz von cDNA. Die Abbildung zeigt ein typisches Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

#### **3.3.2 Die Wirkung von Nikotin am Kolonepithel der Ratte**

Da in den vorhergehenden Versuchen die Expression von epithelialen nikotinergen Acetylcholinrezeptoren nachgewiesen werden konnte, war es nun interessant zu untersuchen, welche Wirkung eine Stimulation dieser Rezeptoren am Kolonepithel der Ratte hat.

##### **3.3.2.1 Der Nikotinrezeptor-Agonist DMPP induziert einen TTX-resistenten Anstieg des $I_{sc}$ an der Kolonmukosa**

Zunächst wurden Ussingkammer-Versuche mit Dimethylphenylpiperazinium (DMPP,  $10^{-4}$  mol/l auf der serosalen Seite), einem Agonisten an nikotinergen Acetylcholinrezeptoren (Tapper und Lewand 1981), in Anwesenheit von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) durchgeführt. Nach der Applikation von DMPP zu Kolonmukosa-Präparaten kam es zu einem transienten, Tetrodotoxin-resistenten Anstieg des  $I_{sc}$  (Abb. 3.23, linke Seite der Grafik). Bei Vorbehandlung der Mukosa mit Hexamethonium ( $10^{-5}$  mol/l auf der serosalen Seite), einem Antagonisten der nikotinergen Acetylcholinrezeptoren (Starke 2001), induzierte DMPP jedoch keinen Anstieg des  $I_{sc}$  mehr (Abb. 3.23, rechte Seite der Grafik). Mit diesem Versuch konnte der Nachweis erbracht werden, dass nikotinerge Acetylcholinrezeptoren offensichtlich auch im Kolonepithel von funktioneller Bedeutung sind und nicht nur, wie bisher angenommen, am enterischen Nervensystem eine Rolle spielen (Zhou et al. 2002).

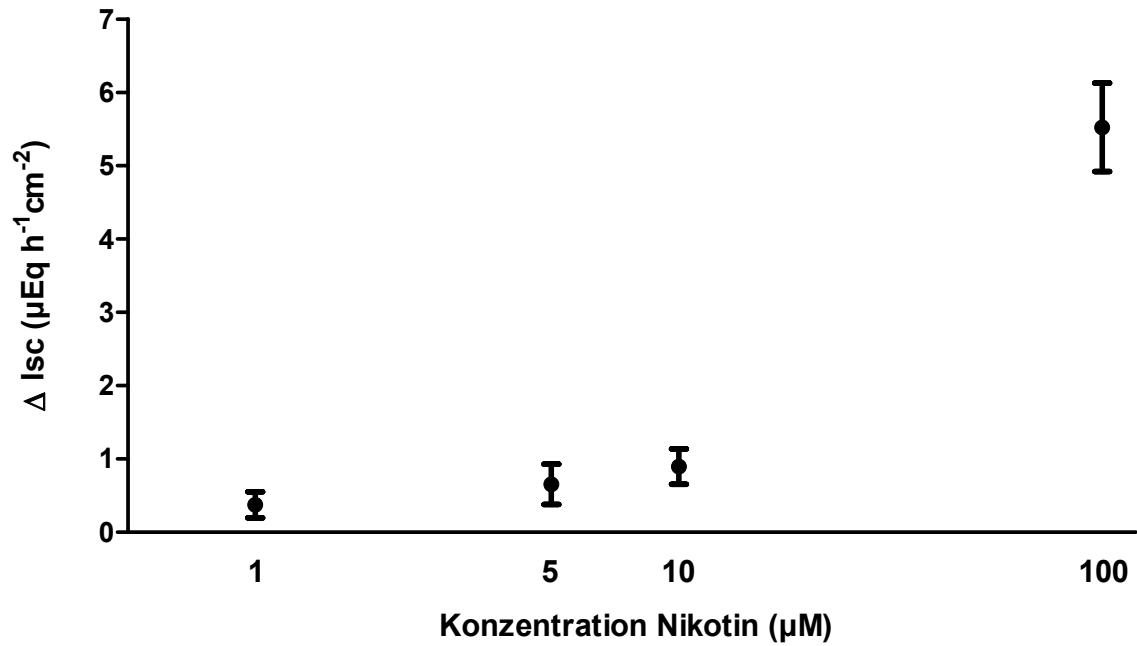


**Abb. 3.23: Funktioneller Nachweis von nikotinergen Acetylcholinrezeptoren an der Kolonmukosa**

Die Zugabe von DMPP ( $10^{-4}$  mol/l, auf der serosalen Seite), einem Agonisten der nikotinergen Acetylcholinrezeptoren, führte zu einem transienten Anstieg des  $I_{sc}$  in Gegenwart von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite, linker Teil der Grafik). Wurde das Gewebe jedoch mit Hexamethonium ( $10^{-5}$  mol/l auf der serosalen Seite), einem Antagonisten der nikotinergen Acetylcholinrezeptoren, vorbehandelt, so konnte durch DMPP-Applikation ( $10^{-4}$  mol/l auf der serosalen Seite) kein Anstieg des  $I_{sc}$  mehr hervorgerufen werden (rechter Teil der Grafik). Gezeigt sind gemittelte Kurven  $\pm$  SEM (graue Fläche). Die Unterbrechungen der Kurven kommen durch Weglassen von Zeitintervallen von etwa 5 - 10 min zustande. Diese waren notwendig um die einzelnen Kurven auf die Zugabe der jeweiligen Substanz zu synchronisieren;  $n = 6$ .

### 3.3.2.2 Nikotin induziert einen konzentrationsabhängigen Anstieg des $I_{sc}$ an der Kolonmukosa

Im Anschluss wurden Ussingkammer-Versuche mit Kolonmukosa-Präparaten durchgeführt, bei denen Nikotin in verschiedenen Konzentrationen ( $10^{-6}$  mol/l bis  $10^{-4}$  mol/l, auf der serosalen Seite) in Anwesenheit von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) appliziert wurde. Die Zugaben der unterschiedlichen Konzentrationen erfolgten an demselben Gewebestück mit zwischengeschalteten Waschschritten. Es sollte überprüft werden, ob auch Nikotin als klassischer Agonist der nikotinergen Acetylcholinrezeptoren genauso wie DMPP in der Lage ist einen Anstieg im  $I_{sc}$  an der Kolonmukosa zu induzieren. Wie aus Abbildung 3.24 zu ersehen ist, führte Nikotin zu einem Anstieg des Kurzschlussstromes. Mit zunehmender Nikotin-Konzentration nahm auch die Amplitude der Antwort zu; eine Nikotin-Konzentration von  $10^{-4}$  mol/l induzierte einen Anstieg von  $5,52 \pm 0,60 \mu\text{Eq/h} \cdot \text{cm}^2$ . Für die weiteren Versuche wurde Nikotin in einer Konzentration von  $10^{-4}$  mol/l eingesetzt.



**Abb. 3.24: Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Nikotin**

Nikotin wurde in verschiedenen Konzentrationen aufeinanderfolgend auf der serosalen Seite appliziert. Vor jeder Applikation der nächsthöheren Konzentration wurde Nikotin ausgewaschen. Die Versuche wurden in Anwesenheit von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) durchgeführt. Die Symbole stellen Mittelwerte für die Veränderung des Kurzschlussstroms ( $\Delta I_{sc}$ ) im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen Baseline direkt vor Zugabe von Nikotin dar. Die vertikalen Linien stehen für den mittleren Fehler des Mittelwerts (SEM);  $n = 6$ .

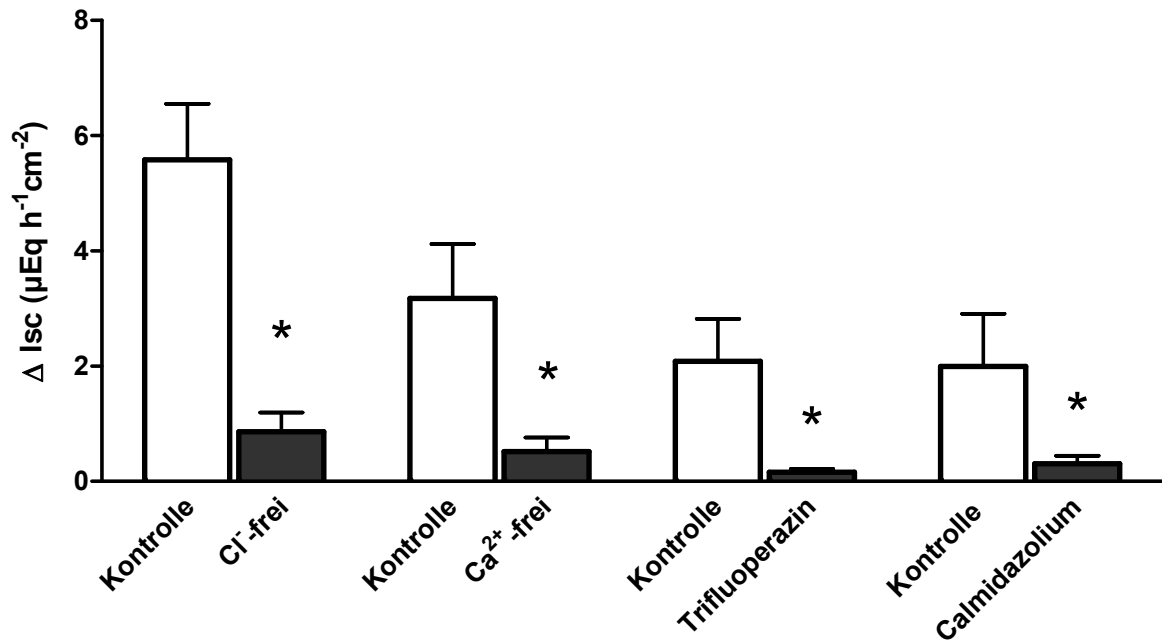
### 3.3.2.3 Der Nikotin-induzierte $I_{sc}$ -Anstieg wird von einer $Cl^-$ -Sekretion getragen und ist $Ca^{2+}$ -abhängig

Vom Kolonepithel freigesetztes Acetylcholin induziert einen Anstieg des  $I_{sc}$ , der von einer  $Cl^-$ -Sekretion getragen wird (siehe Kap. 1.4.5). Um zu überprüfen, ob dasselbe für den Nikotin-induzierten  $I_{sc}$  an Kolonmukosa-Präparaten gilt, wurden  $Cl^-$ -Substitutionsversuche in der Ussingkammer durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine Pufferlösung, in der  $Cl^-$  durch das impermeable Anion Gluconat ersetzt wurde (siehe Abschn. 2.2.2.2), sowohl auf serosaler als auch auf mukosaler Seite eingewaschen. Unter diesen Bedingungen war der  $I_{sc}$ -Anstieg nach Applikation von Nikotin ( $10^{-4}$  mol/l auf der serosalen Seite) signifikant gegenüber den Kontrollgeweben, die mit  $Cl^-$ -haltigem Puffer inkubiert waren, reduziert ( $P < 0,05$ ,  $n = 8$ , siehe Abb. 3.25). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Nikotin-Antwort am Kolonepithel von einer Sekretion von  $Cl^-$ -Ionen abhängig ist.

Eine  $Cl^-$ -Sekretion am Kolonepithel wird unter anderem durch einen Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration induziert. Diese Konzentrationserhöhung kann entweder durch Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern oder durch den Einstrom aus dem Extrazellulärraum über Kanäle in der Plasmamembran bedingt sein. Um den Einfluss von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  auf den Nikotin-induzierten Anstieg des  $I_{sc}$  zu untersuchen, wurde auf der basolateralen Seite der Mukosapräparate ein  $Ca^{2+}$ -freier Puffer (siehe Kap 2.2.2.3) eingewaschen. In Anwesenheit von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) wurde Nikotin ( $10^{-4}$  mol/l auf der serosalen Seite) appliziert. Der hierdurch induzierte  $I_{sc}$ -Anstieg war signifikant gegenüber der in der Standard-Parsonslösung gemessenen Kontrolle vermindert ( $P < 0,05$ ,  $n = 6 - 8$ , siehe Abb. 3.25). Die Nikotin-Antwort des Kolonepithels ist also von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  abhängig.

Eine der klassischen Signalkaskaden, bei der  $Ca^{2+}$  eine wichtige Rolle spielt, ist der  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-Weg. Deshalb wurden Versuche mit den Calmodulin-Antagonisten Trifluoperazin (Kleene 1994) und Calmidazolium (Adkins et al. 2000) durchgeführt. Eine Inkubation der Kolonmukosa mit Trifluoperazin ( $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l auf der serosalen Seite) führte zu einer signifikanten Hemmung der Nikotin-Antwort gegenüber den unbehandelten Kontrollen ( $P < 0,05$ ,  $n = 10$ ; siehe Abb. 3.25). Auch Calmidazolium ( $5 \cdot 10^{-7}$  mol/l auf der serosalen Seite) hemmte den Nikotin-induzierten  $I_{sc}$ -Anstieg signifikant gegenüber den Kontrollgeweben ( $P < 0,05$ ,  $n = 7$ , siehe Abb. 3.25).





**Abb. 3.25: Nikotin induziert eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige  $\text{Cl}^-$ -Sekretion**

Dargestellt ist der Anstieg des  $I_{sc}$  ( $\Delta I_{sc}$ ) nach Zugabe von Nikotin ( $10^{-4}$  mol/l auf der serosalen Seite) im Vergleich zu einer über 3 min gemessenen Baseline direkt vor der Zugabe. Die weißen Balken stehen für die Kontrollen ohne Inhibitor, die grauen Balken für die Versuche mit den entsprechenden Inhibitoren. Alle Versuche wurden in Anwesenheit von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) durchgeführt. Die Balken stellen Mittelwerte für den Anstieg des  $\Delta I_{sc}$  dar. Die vertikalen Linien stehen für den SEM;  $n = 6 - 10$ , \*  $P < 0.05$  versus  $\Delta I_{sc}$  der entsprechenden Kontrollgruppe.

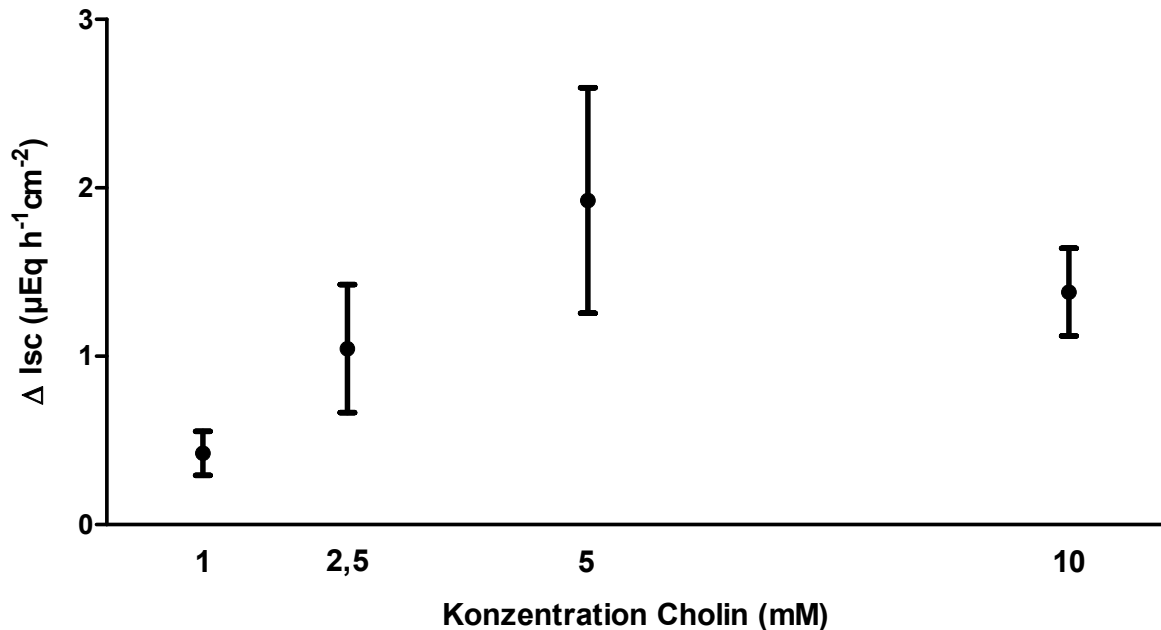
### 3.4 Atypische Agonisten

#### 3.4.1 Cholin

In der Literatur ist Cholin sowohl als Agonist (Alkondon et al. 1997) als auch als Antagonist (Alkondon und Albuquerque 2006) für (neuronale) nikotinerge Acetylcholinrezeptoren beschrieben. Cholin ist ebenfalls als Agonist für muskarinerge Acetylcholinrezeptoren beschrieben (Shi et al. 1999). Mit den folgenden Versuchen sollte die Wirkung von Cholin auf die epithelialen Acetylcholinrezeptoren des Kolons untersucht werden, da bei der Spaltung von Acetylcholin durch die Acetylcholinesterase Cholin entsteht, welches eventuell weitere Wirkungen am Epithel entfalten könnte.

##### 3.4.1.1 Cholin induziert einen konzentrationsabhängigen Anstieg des $I_{sc}$ im distalen Kolon

Da, wie oben erwähnt, auch neuronale Wirkungen von Cholin bekannt sind, wurden die Experimente mit Cholin an Mukosa-Submukosa-Präparaten des distalen Kolons, also mit intakter Innervation des Kolonepithels durch den Plexus submucosus, durchgeführt. In Ussingkammer-Versuchen wurde Cholin in Konzentrationen von  $10^{-3}$  mol/l,  $2,5 \cdot 10^{-3}$  mol/l,  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/l und  $10^{-2}$  mol/l auf der serosalen Seite appliziert. Es wurde jeweils nur eine Konzentration je Gewebestück verabreicht um eine Desensitivierung zu vermeiden. Bereits nach Zugabe in einer Konzentration von  $10^{-3}$  mol/l löste Cholin einen Anstieg des  $I_{sc}$  aus. Eine maximale Reaktion des  $I_{sc}$  bei Zugabe von Cholin wurde bei einer Konzentration von  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/l beobachtet. Mit dieser Konzentration stieg der  $I_{sc}$  um  $1,93 \pm 0,67 \mu\text{Eq/h} \cdot \text{cm}^2$  (Abb. 3.26). Für die folgenden Versuche wurde Cholin im Regelfall in einer Konzentration von  $7,5 \cdot 10^{-3}$  mol/l (auf der serosalen Seite) verwendet, da die Streuung im  $I_{sc}$  Anstieg bei  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/l sehr groß war.



**Abb. 3.26: Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Cholin**

Cholin wurde in verschiedenen Konzentrationen auf der serosalen Seite von Mukosa-Submukosa-Präparaten appliziert. Cholin wurde nur einmal an einem Gewebe appliziert, um eine Desensitivierung zu vermeiden. Die Symbole stellen Mittelwerte für die Veränderung des Kurzschlussstroms ( $\Delta I_{sc}$ ) im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen Baseline direkt vor Zugabe von Cholin dar. Die vertikalen Linien stehen für den mittleren Fehler des Mittelwerts (SEM);  $n = 5 - 6$ .

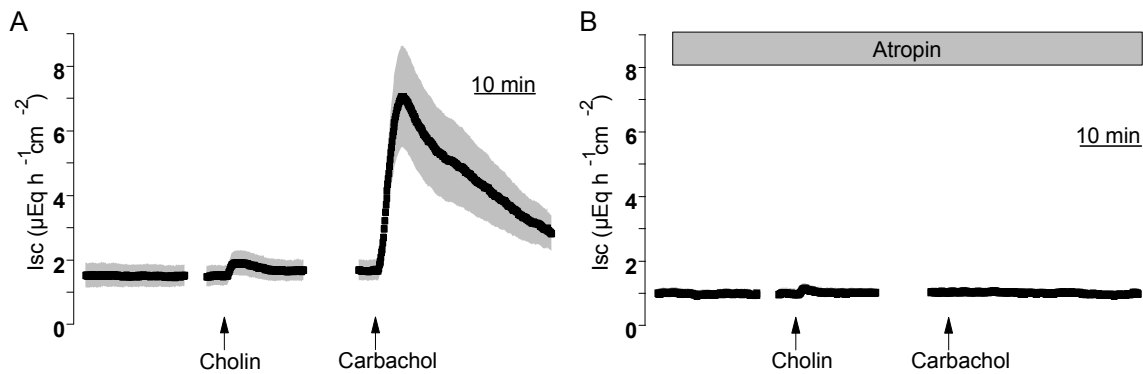
#### 3.4.1.2 Cholin induziert eine Tetrodotoxin-resistente, Atropin-sensitive $\text{Cl}^-$ -Sekretion

Um zu untersuchen, ob die Cholin-induzierten Veränderungen des  $I_{sc}$  von der Aktivität enterischer Neurone abhängig sind, wurden die Gewebe vor der Cholin-Applikation mit Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) vorbehandelt. Wie Tabelle 3.6 zu entnehmen ist, führte eine Prä-Inkubation mit Tetrodotoxin zu keiner wesentlichen Veränderung des Cholin-induzierten  $I_{sc}$ -Anstiegs. Da aufgrund dieser Ergebnisse eine Beteiligung enterischer Neurone ausgeschlossen werden kann, wurde bei den folgenden Versuchen aus Kostengründen auf den Einsatz von Tetrodotoxin verzichtet.

Um eine Beteiligung von Chloridionen am Cholin-induzierten Anstieg des  $I_{sc}$  zu überprüfen, wurden  $\text{Cl}^-$ -Substitutionsversuche in der Ussingkammer an Mukosa-Submukosa-Präparaten durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde eine Pufferlösung, in der  $\text{Cl}^-$  durch das impermeable Anion Gluconat ersetzt wurde (siehe Kap. 2.2.2.2), sowohl auf serosaler als auch auf mukosaler Seite eingewaschen.

Unter diesen Bedingungen war der  $I_{sc}$  Anstieg nach Applikation von Cholin ( $7,5 \cdot 10^{-3}$  mol/l auf der serosalen Seite) um 75 % gegenüber den Kontrollgeweben reduziert ( $n = 5-6$ , siehe Tab. 3.6). Da die Hemmung der Cholin-Antwort jedoch keine Signifikanz erreichte, wurde in einer weiteren Versuchsreihe der  $Na^+-K^+-2Cl^-$ -Cotransporter (NKCC1) gehemmt, der Haupttransportweg, über den das Kolonepithel basolateral  $Cl^-$ -Ionen aufnimmt (Barrett und Keely 2000). Dieser Transporter kann durch Bumetanid gehemmt werden (Kaplan et al. 1996). Eine Vorbehandlung der Mukosa-Submukosa-Präparate mit Bumetanid ( $10^{-4}$  mol/l auf der serosalen Seite) führte zu einer signifikanten Hemmung des Cholin-induzierten  $I_{sc}$ -Anstiegs ( $P < 0,05$  im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe;  $n = 7 - 8$ , siehe Tab. 3.6). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Cholin-Antwort am Kolonepithel von einer Sekretion von  $Cl^-$ -Ionen getragen wird.

Um zu untersuchen, ob epitheliale Acetylcholinrezeptoren an der Cholin-Antwort beteiligt sind, wurden im Anschluss Versuche mit Inhibitoren der nikotinergen (Hexamethonium) und der muskarinergen (Atropin) Acetylcholinrezeptoren durchgeführt. Die Vorbehandlung des Gewebes mit Hexamethonium ( $10^{-4}$  mol/l, auf der serosalen Seite) führte lediglich zu einer leichten, statistisch nicht signifikanten Verminderung des Cholin-induzierten  $I_{sc}$ -Anstiegs von 25 % ( $n = 6$ , Tab. 3.6). Im Gegensatz dazu führte eine Vorbehandlung mit Atropin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) zu einer signifikanten Hemmung des Cholin-induzierten  $I_{sc}$ -Anstiegs ( $P < 0,05$  im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe,  $n = 6$ , Abb. 3.27 und Tab. 3.6).



**Abb. 3.27: Der Cholin-induzierte Anstieg des  $I_{sc}$  kann durch Atropin gehemmt werden**

Die Zugabe von Cholin ( $7,5 \cdot 10^{-3}$  mol/l, auf der serosalen Seite) führte zu einem transienten Anstieg des  $I_{sc}$  (linker Teil der Grafik). Wurde das Gewebe jedoch mit Atropin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite), einem Antagonisten der muskarinergen Acetylcholinrezeptoren, vorbehandelt, so war der durch Cholin-Applikation ( $7,5 \cdot 10^{-3}$  mol/l auf der serosalen Seite) hervorgerufene Anstieg des  $I_{sc}$  signifikant gehemmt (rechter Teil der Grafik). Gezeigt sind gemittelte Kurven  $\pm$  SEM (graue Fläche). Die Unterbrechungen der Kurven kommen durch Weglassen von Zeitintervallen von etwa 5 - 10 min zustande. Diese waren notwendig, um die einzelnen Kurven auf die Zugabe der jeweiligen Substanz zu synchronisieren;  $n = 6$ .

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, dass die Cholin-Antwort am Kolonepithel von muskarinergen Acetylcholinrezeptoren vermittelt wird. Am Kolonepithel sind die Subtypen M1 und M3 des muskarinergen Acetylcholinrezeptors beschrieben. Mithilfe von selektiven Inhibitoren dieser Subtypen sollte überprüft werden, welcher der beiden die Cholin-Antwort vermittelt.

Zur Hemmung des M1-muskarinergen Acetylcholinrezeptors wurde das Gewebe mit Telenzepin (Galvan et al. 1989) bzw. mit Pirenzepin (Starke 2001) vorbehandelt. Eine Vorbehandlung des Gewebes mit Telenzepin ( $10^{-7}$  mol/l auf der serosalen Seite) führte zu einer Hemmung des Cholin-induzierten  $I_{sc}$ -Anstiegs um mehr als 60 % ( $n = 6$ , Tab. 3.6). Diese Hemmung erreichte jedoch keine Signifikanz, da die Streuung der Cholin-Antwort der Kontrollgewebe sehr groß war. Eine Vorbehandlung mit Pirenzepin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) verminderte den Anstieg des  $I_{sc}$  um die Hälfte ( $n = 6$ , Tab. 3.6). Auch diese Hemmung erreichte aufgrund der großen Streuung der Kontrollantwort keine Signifikanz.

Als Inhibitoren der M3-muskarinergen Acetylcholinrezeptoren wurden Darifenacin (Zinner 2007) und J104129 (Mitsuya et al. 1999) eingesetzt. Sowohl die Prä-Inkubation des Gewebes mit Darifenacin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) als

auch diejenige mit J104129 ( $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) führte zu einer signifikanten Hemmung der Cholin-Antwort ( $n = 6 - 8$ , Tab. 3.6).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Cholin-Antwort am Kolonepithel im Wesentlichen von M3-muskarinergen Acetylcholinrezeptoren (unterstützt durch M1-muskarinerge Acetylcholinrezeptoren) vermittelt wird. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Cholin am distalen Kolon eine direkt am Epithel ausgelöste, also nicht über enterische Neurone vermittelte  $\text{Cl}^-$ -Sekretion, induziert. Diese ist durch Atropin, jedoch nicht durch Hexamethonium hemmbar, wird also über muskarinerge Rezeptoren vermittelt.

**Tab. 3.6: Cholin induziert eine TTX-resistente Chloridsekretion, die durch muskarinerge Acetylcholinrezeptoren vermittelt wird**

Bedingungen	$\Delta I_{sc}$ ( $\mu\text{Eq/h}\cdot\text{cm}^2$ )	n
- Tetrodotoxin	$0,38 \pm 0,10$	6
+ Tetrodotoxin	$0,36 \pm 0,06$	6
<b>Chloridsekretion</b>		
- $\text{Cl}^-$ -frei	$1,19 \pm 0,43$	5
+ $\text{Cl}^-$ -frei	$0,30 \pm 0,26$	6
- Bumetanid	$0,64 \pm 0,18$	7
+ Bumetanid	$0,15 \pm 0,03^*$	8
<b>Nikotinerge ACh-Rezeptoren</b>		
- Hexamethonium	$1,17 \pm 0,23$	6
+ Hexamethonium	$0,99 \pm 0,24$	6
<b>Muskarinerge ACh-Rezeptoren</b>		
- Atropin	$0,48 \pm 0,07$	6
+ Atropin	$0,19 \pm 0,04^*$	6
<b>M1-ACh-Rezeptoren</b>		
- Telenzepin	$0,94 \pm 0,27$	6
+ Telenzepin	$0,35 \pm 0,07$	6
- Pirenzepin	$1,14 \pm 0,33$	6
+ Pirenzepin	$0,53 \pm 0,12$	6
<b>M3-ACh-Rezeptoren</b>		
- Darifenacin	$0,75 \pm 0,09$	8
+ Darifenacin	$0,35 \pm 0,08^*$	8
- J104129	$0,51 \pm 0,07$	6
+ J104129	$0,12 \pm 0,03^*$	6

Gemessen wurde der  $I_{sc}$ -Anstieg nach Cholin-Zugabe ( $7,5 \cdot 10^{-3}$  mol/l auf der serosalen Seite; bei der Versuchsreihe mit Hexamethonium betrug die CholinKonzentration  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/l auf der serosalen Seite) in Abwesenheit (jeweils die obere Zeile) oder in Anwesenheit (jeweils die untere Zeile) von Tetrodotoxin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite), von Chlorid-freiem Puffer (auf der mukosalen und der serosalen Seite), Bumetanid ( $10^{-4}$  mol/l auf der serosalen Seite), Hexamethonium ( $10^{-4}$  mol/l auf der serosalen Seite), Atropin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite), Telenzepin ( $10^{-7}$  mol/l auf der serosalen Seite), Pirenzepin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite), Darifenacin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) und J104129 ( $5 \cdot 10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite). Die Daten stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM für den Anstieg des  $I_{sc}$  ( $\Delta I_{sc}$ ) im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen Baseline direkt vor der Cholin-Applikation dar. \*  $P < 0,05$  versus  $\Delta I_{sc}$  der entsprechenden Kontrollgruppe.

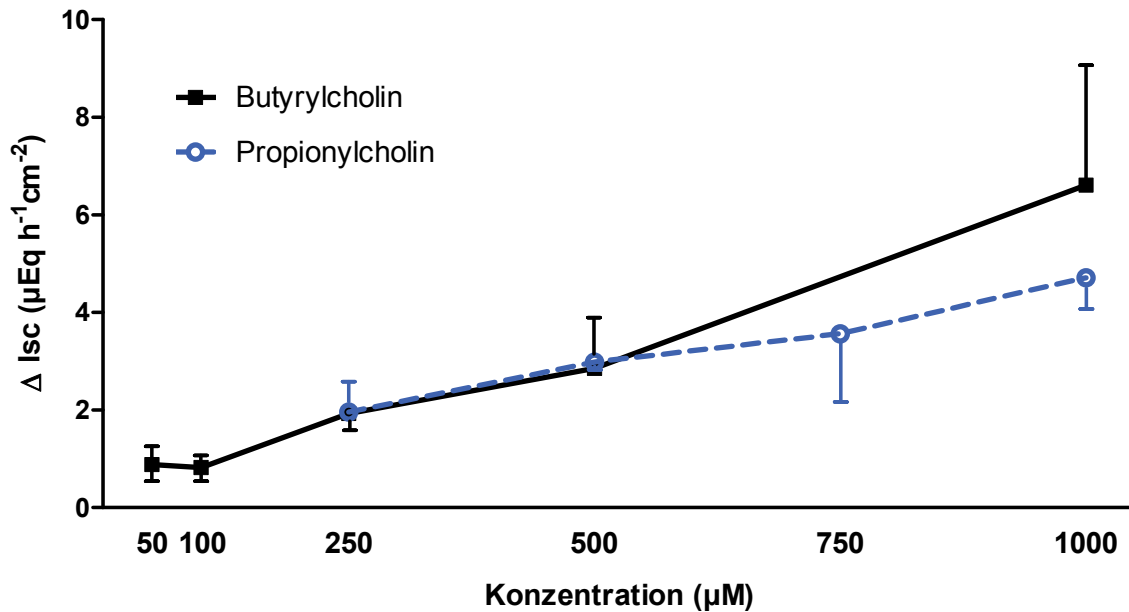
### 3.4.2 Butyrylcholin und Propionylcholin

Acetylcholin wird mithilfe der Cholinacetyltransferase (ChAT) aus den Substraten Cholin und Acetyl-CoA synthetisiert. Die ChAT zeigt zwar eine hohe Spezifität für Cholin, akzeptiert jedoch unterschiedliche Acylgruppen. An cerebralem Gewebe der Ratte konnte gezeigt werden, dass die ChAT dieselbe Affinität für Acetyl-CoA, Propionyl-CoA und Butyryl-CoA aufweist (Rossier 1977). Dies legt die Vermutung nahe, dass die ChAT auch an der Synthese von Butyrylcholin und Propionylcholin beteiligt ist (Rossier 1977). Da die Expression der ChAT im Kolonepithel der Ratte nachgewiesen werden konnte (Kap. 3.1.2) und das Kolonepithel durch die Fermentation von Strukturkohlenhydraten permanent hohen Konzentration an Butyrat und Propionat ausgesetzt ist (Binder 2010), sollte mit den nächsten Versuchen überprüft werden, ob Butyrylcholin und Propionylcholin als Agonisten der epithelialen Acetylcholinrezeptoren am distalen Kolon der Ratte wirksam sind.

#### 3.4.2.1 Butyrylcholin und Propionylcholin induzieren einen konzentrationsabhängigen $I_{sc}$ -Anstieg

In Ussingkammer-Versuchen mit Mukosa-Submukosa-Präparaten des distalen Kolons wurden Butyrylcholin und Propionylcholin in unterschiedlichen Konzentrationen auf der serosalen Seite appliziert. Es wurde jeweils nur eine Konzentration je Gewebestück verabreicht um eine Desensitivierung zu vermeiden. Butyrylcholin wurde in folgenden Konzentrationen appliziert:  $5 \cdot 10^{-5}$  mol/l,  $10^{-4}$  mol/l,  $2,5 \cdot 10^{-4}$  mol/l,  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l und  $10^{-3}$  mol/l. Propionylcholin wurde in folgenden Konzentrationen zugegeben:  $2,5 \cdot 10^{-4}$  mol/l,  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l,  $7,5 \cdot 10^{-4}$  mol/l und  $10^{-3}$  mol/l. Sowohl Butyrylcholin als auch Propionylcholin induzierte einen Anstieg des  $I_{sc}$ , dessen Amplitude mit steigender Konzentration zunahm. Der bei einer Konzentration von  $2,5 \cdot 10^{-4}$  mol/l und  $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l induzierte  $I_{sc}$ -Anstieg war für beide Substanzen nahezu gleich. Bei einer Butyrylcholin Konzentration von  $10^{-3}$  mol/l stieg der  $I_{sc}$  um  $6,61 \pm 2,44 \mu\text{Eq/h} \cdot \text{cm}^2$ . Propionylcholin mit derselben Konzentration induzierte einen  $I_{sc}$ -Anstieg um  $4,71 \pm 0,66 \mu\text{Eq/h} \cdot \text{cm}^2$  (Abb. 3.28).





**Abb. 3.28: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Butyrylcholin und Propionylcholin**

Butyrylcholin und Propionylcholin wurden in verschiedenen Konzentrationen auf der serosalen Seite von Mukosa-Submukosa-Präparaten appliziert. Die Agonisten wurden nur einmal an einem Gewebe appliziert, um eine Desensitivierung zu vermeiden. Die Symbole stellen Mittelwerte für die Veränderung des Kurzschlussstroms ( $\Delta I_{sc}$ ) im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen Baseline direkt vor Zugabe der Agonisten dar. Die vertikalen Linien stehen für den mittleren Fehler des Mittelwerts ( $\pm$  SEM). Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist lediglich entweder - SEM oder + SEM dargestellt;  $n = 3 - 4$ .

### 3.4.2.2 Der durch Butyrylcholin und Propionylcholin induzierte Anstieg des $I_{sc}$ entsteht durch Stimulation von Muskarinrezeptoren

Nachdem für Cholin gezeigt werden konnte, dass der  $I_{sc}$ -Anstieg durch Atropin signifikant gehemmt wird (Tab. 3.6), sollte nun eine Beteiligung der muskarinergen Acetylcholinrezeptoren an der Butyrylcholin- bzw. Propionylcholin-Antwort überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden Mukosa-Submukosa-Präparate mit Atropin ( $10^{-5}$  mol/l auf der serosalen Seite) vorbehandelt. Dadurch konnte sowohl der durch Butyrylcholin ( $5 \cdot 10^{-4}$  mol/l auf der serosalen Seite, Tab. 3.7) als auch der durch Propionylcholin ( $10^{-3}$  mol/l auf der serosalen Seite, Tab. 3.7) induzierte  $I_{sc}$ -Anstieg signifikant gehemmt werden. Bei Prä-Inkubation des Gewebes mit einer geringeren Atropinkonzentration ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite) erreichte die Hemmung des  $I_{sc}$  Anstiegs keine statistische Signifikanz. In dieser Versuchsserie induzierte Butyrylcholin ( $10^{-4}$  mol/l auf der serosalen Seite) einen Anstieg des  $I_{sc}$  von  $6,16 \pm 2,83 \mu\text{Eq/h} \cdot \text{cm}^2$  bei den Kontrollversuchen ohne Inhibitor und

$1,27 \pm 0,47 \mu\text{Eq/h}\cdot\text{cm}^2$  in Anwesenheit von Atropin ( $10^{-6}$  mol/l auf der serosalen Seite). Diese niedrige Sensitivität gegenüber Atropin kann auf eine hohe Affinität dieser atypischen Cholinester für die Muskarinrezeptoren hindeuten. Diese könnte dann nur mit entsprechend hohen Konzentrationen des kompetitiven Antagonisten Atropin überwunden werden.

Um eine Beteiligung der nikotinergeren Rezeptoren an der Antwort der atypischen Cholinester sicher auszuschließen, wurde für jeden dieser Ester eine Versuchsreihe mit dem nikotinergeren Antagonisten Hexamethonium durchgeführt. Eine Prä-Inkubation mit Hexamethonium ( $10^{-4}$  mol/l auf der serosalen Seite) hatte keinerlei hemmenden Effekt weder auf den  $I_{sc}$  induziert durch Propionylcholin ( $10^{-3}$  mol/l auf der serosalen Seite, Tab. 3.7) noch auf den  $I_{sc}$  induziert durch Butyrylcholin ( $5\cdot 10^{-4}$  mol/l auf der serosalen Seite, Tab. 3.7). Somit konnte gezeigt werden, dass Butyrylcholin und Propionylcholin als Agonisten an muskarinergen Acetylcholinrezeptoren am distalen Kolon wirksam sind.

**Tab. 3.7: Atropin hemmt den  $I_{sc}$ -Anstieg nach Zugabe von Butyrylcholin und Propionylcholin**

Bedingungen	$\Delta I_{sc}$ ( $\mu\text{Eq/h}\cdot\text{cm}^2$ )	n
<b>Butyrylcholin</b>		
- Atropin	$2,95 \pm 0,72$	6
+ Atropin	$0,37 \pm 0,20 *$	6
- Hexamethonium	$3,67 \pm 0,58$	8
+ Hexamethonium	$2,39 \pm 0,71$	8
<b>Propionylcholin</b>		
- Atropin	$3,29 \pm 0,75$	6
+ Atropin	$0,25 \pm 0,10 *$	8
- Hexamethonium	$8,14 \pm 1,17$	6
+ Hexamethonium	$7,00 \pm 0,86$	6

Gemessen wurde der  $I_{sc}$ -Anstieg nach Zugabe von Butyrylcholin ( $5\cdot 10^{-4}$  mol/l auf der serosalen Seite) bzw. Propionylcholin ( $10^{-3}$  mol/l auf der serosalen Seite) in Abwesenheit (jeweils die obere Zeile) oder in Anwesenheit (jeweils die untere Zeile) von Atropin ( $10^{-5}$  mol/l auf der serosalen Seite). Die Daten stellen Mittelwerte  $\pm$  SEM für den Anstieg des  $I_{sc}$  ( $\Delta I_{sc}$ ) im Vergleich zu einer über 3 Minuten gemessenen Baseline direkt vor der Applikation von Butyrylcholin bzw. Propionylcholin dar. \*  $P < 0,05$  versus  $\Delta I_{sc}$  der entsprechenden Kontrollgruppe

## 4 Diskussion

Acetylcholin ist nicht nur ein Neurotransmitter, sondern wird auch von zahlreichen nicht-neuronalen Zellen synthetisiert und freigesetzt (Übersicht siehe: Wessler et al. 1998). In den Kolonepithelzellen von Mensch und Ratte wurde sowohl Acetylcholin selbst als auch die Expression der Cholinacetyltransferase, also des Schlüsselenzyms der Acetylcholinsynthese, nachgewiesen (Klapproth et al. 1997). Darüber hinaus konnte eine Propionat-induzierte Acetylcholinfreisetzung an Kolonmukosa-Präparaten gezeigt werden (Yajima et al. 2011a); beide Beobachtungen lassen eine funktionelle Bedeutung von epithelial gebildetem Acetylcholin in diesen Zellen vermuten. Ein Ziel meiner Studie war, das non-neuronale cholinerge System am Kolonepithel der Ratte genauer zu charakterisieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Kolonepithelzellen alle notwendigen Komponenten für Synthese, Freisetzung, Signalvermittlung, Abbau und Recycling von Acetylcholin besitzen und darüber hinaus, neben muskarinergen Rezeptoren, auch nikotinerge Rezeptoren exprimieren, die an der Regulation des Ionentransports beteiligt sind.

### 4.1 Non-neuronales Acetylcholin: von der Synthese zur Freisetzung

#### 4.1.1 Synthese von Acetylcholin

Die Acetylcholinsynthese aus Acetyl-CoA und Cholin kann in nicht-neuronalen Zellen prinzipiell von zwei Enzymen katalysiert werden, der Cholinacetyltransferase (ChAT) und der Carnitinacetyltransferase (CarAT) (Lips et al. 2007b).

Die Cholinacetyltransferase konnte bereits in zahlreichen nicht-neuronalen Geweben nachgewiesen werden, wie z. B. im Trachealepithel (Reinheimer et al. 1996), in der Plazenta von Mensch und Ratte (Pfeil et al. 2004, Wessler und Kirkpatrick 2008), in der Haut und in Immunzellen (Übersicht siehe: Wessler und Kirkpatrick 2008). Auch im Kolonepithel des Menschen wurde die Expression der Cholinacetyltransferase auf Protein-Ebene beschrieben (Klapproth et al. 1997). Dies ließ sich in der vorliegenden Arbeit für das Kolonepithel der Ratte mittels Immunfluoreszenzmarkierung bestätigen. Die Intensität des Signals war im Oberflächenepithel und im oberen Kryptendrittel am stärksten ausgeprägt (Abb. 3.6, obere Reihe). Die Expression konnte auf

mRNA-Ebene mittels RT-PCR bestätigt werden (Abb 3.7). Allerdings war die ChAT-mRNA nur nachweisbar, wenn als Ausgangsmaterial RNA aus Epithelzellen eingesetzt wurde. Diese konnten durch vorsichtiges Abschaben des Oberflächenepithels mittels eines Objektträgers gewonnen werden. Bei Verwendung von RNA aus isolierten Krypten war ChAT-mRNA nicht detektierbar. Da bei den PCR-Reaktionen mit dem Referenzgewebe bei der nachfolgenden Gelelektrophorese Banden der erwarteten Größe auftraten, konnten falsche PCR-Bedingungen als Ursache hierfür (weitestgehend) ausgeschlossen werden. Möglicherweise liegt die Ursache darin begründet, dass die ChAT hauptsächlich im Oberflächenepithel des Kolons exprimiert wird und bei Abschabpräparaten im Gegensatz zu isolierten Krypten mehr hiervon enthalten ist.

Neben der Cholinacetyltransferase kann auch die Carnitinacetyltransferase, die als mitochondriales Enzym ubiquitär exprimiert wird, die Acetylcholinsynthese katalysieren (White und Wu 1973, Tucek 1982). Mittels Immunhistochemie wurde ein Signal für die CarAT im Oberflächenepithel und im oberen Drittel der Krypten nachgewiesen (Abb. 3.6, untere Reihe). Die Expression der CarAT in isolierten Krypten konnte mithilfe der RT-PCR bestätigt werden (Abb. 3.7).

Obwohl das Kolonepithel mit beiden zur Acetylcholinsynthese befähigten Enzymen ausgestattet ist, kommt offensichtlich nur der ChAT eine funktionelle Bedeutung für die Bildung dieses Botenstoffes zu. Diesen Schluss legen Ussingkammer-Versuche mit Inhibitoren von ChAT und CarAT nahe. Nach Entleerung des präformiert im Epithel vorliegenden Acetylcholins durch mukosale Zugabe von Propionat wurde die Neusynthese mittels Bromoacetylcholin, einem spezifischen Inhibitor der ChAT (Tucek 1982), gehemmt. Wurde zwei Stunden später unter diesen Bedingungen erneut Propionat appliziert, war der Anstieg des Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$ ), den diese kurzkettige Fettsäure induziert, signifikant gehemmt (Abb. 3.8, Tab. 3.2.). Dieser Anstieg des  $I_{sc}$  wird durch eine Freisetzung von non-neuronalem Acetylcholin aus dem Kolonepithel hervorgerufen, das durch Aktivierung der epithelialen (v. a. muskarinergen) Acetylcholinrezeptoren zu einer Chloridsekretion führt (Yajima et al. 2011a). Wurden die Gewebe hingegen mit Mildronat, einem Blocker der Carnitinacetyltransferase (Jaudzems et al. 2009), vorbehandelt, blieb der Propionat-induzierte Anstieg des  $I_{sc}$  unbeeinflusst (Abb. 3.9 und Tab. 3.2).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Kolonepithel der Ratte sowohl die Cholinacetyltransferase als auch die Carnitinacetyltransferase exprimiert wird. Für die ChAT konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym auch tatsächlich die Acetylcholinsynthese in diesen Zellen katalysiert, denn nach deren Blockade konnte keine Resynthese von Acetylcholin erfolgen. Da eine Blockade der CarAT die Acetylcholinsynthese nicht negativ beeinflusste, scheint diese hierfür am Kolonepithel nicht von Bedeutung zu sein.

### 4.1.2 Speicherung und Freisetzung von Acetylcholin

Es stellte sich die Frage, wie Acetylcholin aus den Kolonepithelzellen freigesetzt wird. In Neuronen wird Acetylcholin nach der Synthese über den vesikulären Acetylcholintransporter (VACHT) aus dem Zytosol in synaptische Vesikel verpackt (Arvidsson et al. 1997) und dort gespeichert, bis es über Exozytose in den synaptischen Spalt freigesetzt wird. Der VACHT konnte auch in einigen nicht-neuronalen Geweben nachgewiesen werden, z. B. in der Plazenta der Ratte (Pfeil et al. 2004) und im Bronchialepithel (Proskocil 2004). Im Kolon der Ratte konnte ich eine Immunoreaktivität auf VACHT mittels immunhistochemischer Färbung entlang der gesamten Kryptenachse beobachten. Das Signal war überwiegend im apikalen Bereich der Epithelzellen zu sehen (Abb. 3.10, obere Reihe). Die Expression konnte auf mRNA-Ebene durch eine RT-PCR bestätigt werden (Abb. 3.11). Vesamicol, ein Hemmstoff des VACHT (Wessler et al. 2001), hatte aber keine Wirkung auf den Propionat-induzierten  $I_{sc}$  (Abb. 3.12 und Tab. 3.3). Da der Anstieg des Kurzschlussstroms in diesem Fall ein Maß für die Acetylcholinfreisetzung ist, konnte somit gezeigt werden, dass der VACHT am Kolonepithel, im Gegensatz zu Neuronen, keine funktionelle Bedeutung für die Speicherung und Freisetzung von Acetylcholin hat. Natürlich stellt sich bei diesen Befunden die Frage, warum der VACHT überhaupt exprimiert wird, wenn er letztlich keine Funktion ausübt. Eine mögliche Erklärung hierfür liefert die Lage des VACHT-Gens, denn die kodierende Sequenz für VACHT liegt im ersten Intron, zwischen den ersten beiden nicht-kodierenden Exons, des ChAT-Gens (Erickson et al. 1994, Übersicht siehe: Eiden 1998). Wegen der verschachtelten Lage beider Gene bezeichnet man den Komplex als *cholinergen Genlokus*.

An cholinergen Neuronen ist die Koexpression von ChAT und VAChT bekannt (Misawa et al. 1995, Weihe et al. 1998). Dasselbe konnte an einigen nicht-neuronalen Geweben, wie z. B. dem Bronchialepithel (Proskocil 2004) und dem Endothel der Pulmonalarterien (Haberberger et al. 2000) beobachtet werden. Auch für die Plazenta wurde nachgewiesen, dass die beiden Proteine koexprimiert werden (Pfeil et al. 2004). Genauso wie in meiner Studie für das Kolonepithel beobachtet (Abb. 3.12 und Tab. 3.3), hatte eine Hemmung des VAChT mit Vesamicol auch an der Plazenta keinen Einfluss auf die Acetylcholinfreisetzung (Wessler et al. 2001). In non-neuronalen Zellen ist also stark davon auszugehen, dass der VAChT ohne funktionelle Bedeutung ist und nur als Nebenprodukt der ChAT-Expression gebildet wird. Da der VAChT auch längst nicht in jedem Gewebe mit non-neuronalem cholinergen System exprimiert wird (also offenkundig viele non-neuronale cholinerge Gewebe die bei der Transkription des cholinergen Genlokus anfallende mRNA für den VAChT schnell wieder abbauen, bevor sie zur Translation kommt), muss es alternative Wege für die Freisetzung von Acetylcholin aus der Zelle geben.

Eine Möglichkeit ist die Freisetzung über die organischen Kationentransporter (OCT1, OCT2, OCT3). Das sind polyspezifische Transporter, die neben zahlreichen Kationen und schwachen Basen zum Teil auch neutrale Substanzen nach dem Prinzip der erleichterten Diffusion transportieren (Koepsell 2013). Diese Transporter werden in vielen nicht-neuronalen Zellen exprimiert, z. B. in Niere, Leber, Harnblase und Plazenta (Übersicht siehe: Koepsell et al. 2007). Dass das organische Kation Acetylcholin im non-neuronalen System ein Substrat für die organischen Kationentransporter ist, wurde in mehreren unabhängigen Arbeiten bestätigt. Es scheint jedoch in den verschiedenen Spezies und Geweben zu differieren, welche der drei Isoformen die Freisetzung von Acetylcholin vermitteln. Wessler et al. (2001) konnten für die humane Plazenta zeigen, dass die Acetylcholinfreisetzung über OCT1 und OCT3 erfolgt. An mit den entsprechenden OCT Isoformen transfizierten *Xenopus*-Oozyten konnte mithilfe elektrophysiologischer Messungen bei OCT1 und OCT2 (von Mensch und Ratte) eine Acetylcholinfreisetzung (und auch eine Aufnahme in die Oozyten bei entsprechenden Konzentrationsgradienten) nachgewiesen werden. Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass Acetylcholin ein Substrat von OCT1 und OCT2, nicht jedoch von OCT3 ist (Lips et al. 2005b).

Desweiteren wurde gezeigt, dass OCT1/2-Doppelknockout-Mäuse im Bronchialepithel einen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen doppelt so hohen Acetylcholingehalt aufweisen, also offenkundig der Wegfall dieser Transporter die basale Freisetzung von Acetylcholin beeinträchtigt, so dass seine intrazelluläre Konzentration ansteigt (Kummer et al. 2006).

Im Kolonepithel der Ratte wurden, wie die vorliegende Arbeit zeigt, das Protein und die mRNA von OCT1, OCT2 und OCT3 mittels Immunhistochemie (Abb. 3.13) bzw. RT-PCR (Abb. 3.14) nachgewiesen. Anhand der Immunfluoreszenzmarkierung ließen sich unterschiedliche Expressionsmuster der drei Isoformen erkennen. Das Signal für den OCT1 war besonders stark ausgeprägt im Oberflächenepithel und im oberen Drittel der Krypten, also in den Regionen wo auch das Enzym für die Acetylcholinsynthese, die Cholinacetyltransferase, exprimiert wird (Abb. 3.13, obere Reihe). Der OCT2 ist im basolateralen Bereich der Kolonepithelzellen lokalisiert und war entlang der gesamten Kryptenachse, jedoch nicht im Oberflächenepithel, zu finden (Abb. 3.13, mittlere Reihe). Das Fluoreszenzsignal für den OCT3 war in der Epithelschicht ohne einen erkennbaren Gradienten entlang der gesamten Kryptenachse zu beobachten (Abb. 3.13, untere Reihe). Darüber hinaus konnte in Ussingkammer-Experimenten gezeigt werden, dass eine Blockade der OCTs durch Omeprazol oder Corticosteron (Literatur zu den verwendeten Hemmstoffen siehe Koepsell et al. 2007, Nies et al. 2011, Wessler et al. 2001, Lips et al. 2005b, Hayer-Zillgen et al. 2002) den Propionat-induzierten  $I_{sc}$  an der Kolonmukosa verminderte. Eine Prä-Inkubation des Gewebes mit Corticosteron führte zu einer nicht-signifikanten Hemmung des Anstiegs im  $I_{sc}$  nach Propionat-Zugabe um etwa 50 %, während Omeprazol den Stromanstieg signifikant um 65 % gegenüber den unbehandelten Kontrollen verminderte (Abb. 3.15 und Tabelle 3.4). Ein kombinierter Einsatz beider Blocker resultierte in einer signifikanten Reduzierung der Propionat-Antwort um 70 % gegenüber den Kontrollgeweben (Tabelle 3.4).

Die Kombination der beiden OCT-Inhibitoren hemmte nicht nur den Propionat-induzierten  $I_{sc}$ -Anstieg signifikant, sondern verminderte auch die Carbachol-Antwort. Carbachol ist ein cholinerges Agonist und wurde nach jedem Versuch zu den Geweben appliziert um eine unspezifische Blockade cholinergischer Rezeptoren durch die eingesetzten Hemmstoffe auszuschließen. Die Verminderung

des  $I_{sc}$ -Anstiegs nach Zugabe von Carbachol ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Corticosteron zurückzuführen, da schon der alleinige Einsatz dieses Inhibitors zu einer Reduzierung der Carbachol-Antwort um ein Drittel gegenüber den Kontrollen führte, während Omeprazol keinerlei Einfluss auf die durch Carbachol-induzierte Sekretion hatte. Zur weiteren Klärung der vermuteten Rolle der organischen Kationentransporter bei der Freisetzung von Acetylcholin aus dem Kolonepithel wurden Pufferproben aus Ussingkammer-Versuchen mithilfe einer HPLC-Analyse untersucht. Es zeigte sich, dass eine Hemmung der OCTs durch die kombinierte Gabe von Omeprazol und Corticosteron die basale Freisetzungsrates von Acetylcholin aus dem Kolonepithel in das basolaterale Kompartiment nicht beeinflusst. Die Propionat-induzierte Acetylcholinfreisetzung jedoch wurde durch die OCT-Inhibitoren signifikant gehemmt (Abb. 3.16). Hieraus kann geschlossen werden, dass die organischen Kationentransporter eine wichtige Rolle bei der Freisetzung von Acetylcholin aus dem Kolonepithel spielen. Darüber hinaus belegen diese Ergebnisse, dass das Kolonepithel auch ohne Stimulus kontinuierlich kleine Mengen an Acetylcholin freisetzt. Da diese basale Freisetzung von einer Blockade der OCTs unbeeinflusst bleibt, scheinen noch weitere Transportmechanismen an der Acetylcholinfreisetzung beteiligt zu sein. Die Frage, welche Transporter sich hierfür verantwortlich zeichnen, muss an dieser Stelle unbeantwortet bleiben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Kolonepithel mRNA sowohl für den vesikulären Acetylcholintransporter als auch für alle drei Isotypen der organischen Kationentransporter existiert. Darüber hinaus konnte auf Protein-Ebene mittels Immunfluoreszenz zum einen der VACHT und zum anderen alle drei Isotypen der OCTs mit ihren unterschiedlichen Expressionsmustern nachgewiesen werden. Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von Acetylcholin aus dem Kolonepithel nach basolateral nicht über den VACHT vermittelt wird, sondern über die OCTs. Diese Befunde stehen im Einklang mit den oben erwähnten Untersuchungen an Plazenta und Bronchialepithel und der These, dass in non-neuronalen Zellen Acetylcholin nicht mittels dem vesikulären Acetylcholintransporter in Vesikeln gespeichert wird und dann durch Exozytose freigesetzt wird. Stattdessen erfolgt eine direkte Freisetzung aus dem Zytoplasma über erleichterte Diffusion vermittelt durch die OCTs.



### 4.1.3 Abbau von Acetylcholin

Das freigesetzte Acetylcholin kann seine Wirkung über Aktivierung von nikotinergen oder muskarinergen Acetylcholinrezeptoren vermitteln. Damit die Wirkung von Acetylcholin auf die Region seiner Freisetzung begrenzt bleibt, bedarf es einer schnellen Inaktivierung. Dies geschieht durch hydrolytische Spaltung durch zwei Cholinesterasen, die Acetylcholinesterase (AChE) und die Butyrylcholinesterase (BuChE), die nahezu ubiquitär in Säugetierzellen verbreitet sind. Die spezifische Acetylcholinesterase zeigt bereits bei niedrigen Acetylcholin-Konzentrationen eine hohe Aktivität und kommt hauptsächlich in cholinergen Nervenfasern und Synapsen vor, sie ist aber auch in zahlreichen non-neuronalen Zellen, wie z. B. Fibroblasten, nicht-innervierten Teilen der Skelettmuskulatur (Sastry und Sadavongvivad 1978) und Erythrozyten (Wessler et al. 1998) zu finden. Die unspezifische Butyrylcholinesterase (auch Pseudocholinesterase genannt), die Acetylcholin nur bei hohem Substratangebot hydrolysiert, wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert und in das Blut abgegeben, sie kommt aber auch in vielen anderen Geweben wie beispielsweise in der Lunge vor (Übersicht siehe: Wessler et al. 1998).

In der Mukosa verschiedener Darmabschnitte konnte speziesabhängig eine hohe Aktivität der Cholinesterasen nachgewiesen werden (Sine et al. 1988). Dieser Befund konnte von mir mithilfe einer enzymhistochemischen Färbung nach Karnovsky und Roots (1964) am distalen Kolon bestätigt werden. Es zeigte sich eine Esteraseaktivität entlang der gesamten Kryptenachse, die besonders stark im mittleren Bereich der Krypte war (Abb. 3.17). Aufgrund der extremen Toxizität des Hemmsstoffes wurde auf den Zusatz von iso-OMPA, einem spezifischen Inhibitor der Butyrylcholinesterase (Koelle et al. 1974), zu dem Inkubationsmedium verzichtet. Deshalb kann nicht unterschieden werden, ob das Reaktionsprodukt durch eine Acetylcholinesterase- oder eine Butyrylcholinesterase-Aktivität zustande kommt, was letztlich für die vorliegende Arbeit aber auch nicht von ausschlaggebender Bedeutung ist. Es war lediglich wichtig zu zeigen, dass das Kolonepithel selbst die enzymatische Ausstattung zur Spaltung und somit zur Inaktivierung von Acetylcholin besitzt. Cholin, eines der beiden Endprodukte der Hydrolyse, kann über verschiedene Transportsysteme wieder in die Zelle aufgenommen werden, um dann erneut für die Synthese von Acetylcholin zur Verfügung zu stehen.

### 4.1.4 Aufnahme von Cholin

Die Aufnahme von Cholin in die Zelle ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Acetylcholinsynthese. In Neuronen erfolgt die (Wieder)aufnahme von Cholin aus dem synaptischen Spalt natriumabhängig über den hochaffinen Cholintransporter (CHT1; Okuda und Haga 2000). Der hochaffine Cholintransport ist funktionell schon seit längerem bekannt, das verantwortliche Protein konnte jedoch erst im Jahre 2000 kloniert werden (Okuda et al. 2000). Die anfangs aufgestellte These, dass der CHT1 spezifisch für Neuronen sei, konnte durch zahlreiche Studien, die den CHT1 auch in non-neuronalen Zellen nachwiesen, widerlegt werden. So wird dieser Transporter u. a. in folgenden Geweben exprimiert: Trachealepithel der Ratte (Pfeil et al. 2003), Urothel der Ratte (Hanna-Mitchell et al. 2007), Arterienendothel von Mensch und Ratte (Lips et al. 2003) oder Keratinozyten der Haut von Mensch und Ratte (Haberberger et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression des CHT1 sowohl mithilfe von immunhistochemischen Markierungen (Abb. 3.1) als auch molekularbiologisch mittels RT-PCR (Abb. 3.2) im Epithel des distalen Kolons nachgewiesen werden. In der immunhistochemischen Darstellung zeigte sich, dass der CHT1 entlang der gesamten Kryptenachse im Epithel exprimiert wird (Abb. 3.1). Dieser Befund widerspricht den Ergebnissen von Yajima et al. (2011a), denn diese Arbeitsgruppe konnte keine CHT1-mRNA in isolierten Krypten nachweisen. Auch die mRNA des vesikulären Acetylcholintransporters konnten sie nur in marginalen Mengen im Kolonepithel nachweisen. Die Ursachen für diese voneinander abweichenden Ergebnisse können zum einen technischer Natur sein und somit z. B. auf die Verwendung unterschiedlicher Kolonsegmente zurückgehen. Eine weitere Möglichkeit wäre eine partielle Degradierung der RNA während der Kryptenisolation und der darauffolgenden Weiterverarbeitung der Krypten, was eine schlechte bis fehlende Nachweisbarkeit von mRNA (die unter Umständen schon von vornherein nur in niedriger Konzentration vorhanden ist) zur Folge hätte. Desweiteren wäre es auch möglich, dass in unterschiedlichen Rattenstämmen die Expressionsmuster der Enzyme und Transporter für das non-neuronale cholinerge System voneinander abweichen.

Zur Überprüfung der funktionellen Bedeutung des CHT1 für die Acetylcholinsynthese im Kolonepithel wurden Ussingkammer-Versuche mit Hemicholinium-3, einem

CHT1-Inhibitor (Cannon 1994), durchgeführt. Die Blockade des CHT1 führte, nach einer vorhergehenden Entleerung des intrazellulär vorliegenden Acetylcholin (Protokoll s. Abb. 3.3), zu einer Hemmung des Propionat-induzierten Anstiegs des  $I_{sc}$  (Abb. 3.4 und Tab. 3.1). Wie bereits erwähnt, wird der Anstieg des  $I_{sc}$  nach Stimulation durch Propionat durch das dadurch freigesetzte Acetylcholin verursacht (Yajima et al. 2011a). Auf den ersten Blick scheint dieses Ergebnis dafür zu sprechen, dass bei Blockade des CHT1 die Wiederaufnahme von Cholin in die Kolonepithelzellen und dadurch die Acetylcholinsynthese gehemmt wird. Dies würde der Situation an repetitiv stimulierten cholinergen submukösen Neuronen entsprechen, an denen Hemicholin-3 die am Epithel ausgelöste Sekretion von Stimulationsphase zu Stimulationsphase (durch Verminderung der Wiederaufnahme von Cholin in die Nervenendigungen) hemmt (Diener et al. 1989a). Da jedoch bekannt ist, dass Hemicholinium-3 auch direkt mit cholinergen Rezeptoren interagieren kann (Madden und Mitchelson 1975), wurden die Gewebe im Anschluss an die zweite Propionat-Applikation mit dem cholinergen Agonisten Carbachol stimuliert. Dabei zeigte sich, dass Hemicholinium-3 auch den Carbachol-induzierten Anstieg des  $I_{sc}$  signifikant hemmte (Tab. 3.1). Da die Kurzschlussstrom-Messungen keine Unterscheidung zwischen tatsächlicher Inhibierung der Acetylcholin-Resynthese und einer unspezifischen Blockade der cholinergen Rezeptoren erlaubt, wurden die Freisetzungsraten von Acetylcholin (in das basolaterale Kompartiment) mittels HPLC-Analyse bestimmt (Abb. 3.5). In Anwesenheit von Hemicholinium-3 war die freigesetzte Menge an Acetylcholin nach der zweiten Zugabe von Propionat nur geringfügig (um ca. 30 %) und statistisch nicht signifikant verringert im Vergleich zur initialen Acetylcholinfreisetzung in Abwesenheit von Hemicholin-3 (siehe Abb. 3.5 B). Anhand dieser Ergebnisse komme ich zu dem Schluss, dass der CHT1, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle während der Aufnahme von Cholin für die Acetylcholinsynthese in das Kolonepithel spielt. Auch für eine Zelllinie des kleinzelligen Lungenkarzinoms (SCLC-Zelllinie) wurde bereits beschrieben, dass ein Knock-Down des CHT1 die Acetylcholinsynthese nicht vermindert (Song et al. 2003). Also müssen andere Transportmechanismen an der Aufnahme von Cholin in diese Zellen beteiligt sein.

Es sind in non-neuronalen Zellen, neben dem CHT1, noch zwei weitere Transportersysteme beschrieben, die für die Aufnahme von Cholin verantwortlich sein können, und zwar die Choline transporter-like proteins (CTL1-5) und die organischen Kationentransporter (OCTs).

Organische Kationentransporter zeigen, wie bereits weiter oben bei der Freisetzung von Acetylcholin, zu der diese Transporter ebenfalls befähigt sind, beschrieben, eine weite Verbreitung sowohl in neuronalem als auch in non-neuronalem Gewebe (Übersicht siehe: Koepsell et al. 2007). OCT1 und OCT2 binden und transportieren das organische Kation Cholin natriumunabhängig und mit niedriger Affinität (Michel et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle drei Isoformen OCT1, 2 und 3 im Kolonepithel exprimiert werden (Abb. 3.13 und 3.14) und dass diese Transporter eine wichtige Rolle bei der Freisetzung von Acetylcholin aus der Zelle spielen (Abb. 3.16). Es ist durchaus vorstellbar, dass die OCTs nicht nur die Freisetzung von Acetylcholin vermitteln, sondern auch für die Aufnahme der Vorläufersubstanz Cholin in die Zelle verantwortlich sind.

Choline transporter-like Proteine transportieren Cholin natriumunabhängig und mit einer mittleren Affinität (Inazu et al. 2005). Diese Transporter finden im Körper eine weite Verbreitung mit unterschiedlichen Expressionsmustern für die einzelnen Isotypen. So kommt der CTL1 vorwiegend im zentralen Nervensystem vor, CTL2-4 sind überwiegend in peripheren Geweben, u. a. in Lunge, in Niere und auch im Kolon, lokalisiert (Übersicht siehe: Traiffort et al. 2013). Song et al. (2013) konnten den CTL4 in verschiedenen Kolonkarzinom-Zelllinien, die den hochaffinen Cholintransporter (CHT1) nicht exprimieren, nachweisen. Von der humanen Adenokarzinom-Zelllinie H508 ist bekannt, dass diese Acetylcholin in Abwesenheit von CHT1 synthetisiert. Ein Knockdown von CTL4 mithilfe von siRNA führte zu einer signifikanten Hemmung der Acetylcholinsynthese und -freisetzung (Song et al. 2013). Inwiefern die CTLs, insbesondere der CTL4, an der Cholinaufnahme in die Kolonepithelzellen der Ratte beteiligt sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, da derzeit noch keine selektiven Hemmstoffe für die CTLs bekannt sind und siRNA-Experimente an intakter Mukosa nicht ohne weiteres möglich sind, da sie einer längeren Vorinkubation unter Gewebekulturbedingungen bedürfen.

#### 4.1.5 Signaltransduktion von epithelialem Acetylcholin

Die kurzkettige Fettsäure Propionat induziert eine Abgabe von Acetylcholin aus dem Kolonepithel über die basolaterale Membran (Yajima et al. 2011a). Deshalb konnte ich Propionat als „pharmakologisches Werkzeug“ einsetzen um Acetylcholin aus dem Kolonepithel freizusetzen. Acetylcholin ist einer der wichtigsten Regulatoren des intestinalen Ionentransportes (Hirota und McKay 2006). Seine Wirkung als sekretagoge Substanz vermittelt es über eine Erhöhung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Epithelzellen. Dazu kommt es durch Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern und durch einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von extrazellulär. Folge des Anstiegs der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist eine  $\text{Cl}^-$ -Sekretion (Diener und Schultheiss 2002).

$\text{Ca}^{2+}$ -Imagingversuche an isolierten Kolonkrypten zeigten, dass die kurzkettige Fettsäure Propionat eine biphasische Änderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bewirkt. Zunächst kam es zu einem geringen, transienten Abfall der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gefolgt von einem transienten Anstieg (Abb. 3.18). Ein Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kann entweder durch einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Extrazellulärraum oder durch eine Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern bedingt sein. Es konnte durch Versuche mit Cyclopiazonsäure (CPA) gezeigt werden, dass der Propionat-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg hauptsächlich von dem Freisetzen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern abhängt. Cyclopiazonsäure ist ein spezifischer Inhibitor der sarkoplasmatischen-endoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, dem wichtigsten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportenzym zur Auffüllung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher (Goeger et al. 1988). Cyclopiazonsäure führt zu einer Entleerung intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher durch Hemmung ihrer Wiederauffüllung. Nach Prä-Inkubation der Krypten mit Cyclopiazonsäure war der durch Propionat induzierte Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration signifikant gehemmt (Abb. 3.19). Wurden die Krypten in einer  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Pufferlösung inkubiert, so war die Propionat-Antwort um fast die Hälfte vermindert, ohne dass dieser Trend allerdings statistische Signifikanz erreichte. Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass der Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Applikation von Propionat vor allem auf einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern beruht und weniger stark von einem Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  abhängt.

Hinsichtlich der morphologisch und funktionell unterschiedlichen Zellen in den Kolonkrypten (Abb. 1.7) konnte kein eindeutiger Unterschied in der Reaktion auf Propionat entlang der Kryptenachse festgestellt werden. Demnach scheint die Propionat-Antwort unabhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen zu sein, da sowohl die unreifen Funduszellen als auch die ausgereiften Oberflächenzellen die gleiche Antwort auf Propionat und das hierdurch freigesetzte Acetylcholin aufwiesen. Lindqvist et al. (1998) berichteten, dass das Acetylcholin-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal im Fundus initiiert wird und sich dann über die Mitte der Krypten hin zur Oberfläche über gap junctions von Zelle zu Zelle ausbreiten soll. Allerdings lässt sich an Kolonkrypten von der Ratte kein Fluss von intrazellulär injizierten Farbstoffen wie etwa Lucifer Yellow von einer Zelle zu Nachbarzellen nachweisen, was eine starke Kopplung durch gap junctions an diesem Epithel unwahrscheinlich macht (M. Diener, unveröffentlichte Ergebnisse).

Ein weiteres Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob lediglich muskarinerge Acetylcholinrezeptoren die Antwort auf das epitheliale Acetylcholin vermitteln oder ob zusätzlich auch nikotinerge Acetylcholinrezeptoren eine Rolle spielen. Am Kolonepithel sind die  $\text{G}\alpha_q/11$ -gekoppelten muskarinergen Acetylcholinrezeptoren M1 und M3 (Lindqvist et al. 1998, Haberberger et al. 2006, Khan et al. 2013) beschrieben, deren Aktivierung über einen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu einer  $\text{Cl}^-$ -Sekretion führt. Über die Expression von nikotinergen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) im Kolonepithel ist bisher wenig bekannt, obwohl einige ihrer Untereinheiten z. B. schon in HT29-Zellen, einer epithelialen Kolonkarzinom-Zelllinie des Menschen, nachgewiesen wurden (Summers et al. 2003).

Versuche mit dem - in niedrigen Konzentrationen eingesetzt - für muskarinerge Rezeptoren spezifischen Inhibitor Atropin führten zu einer Reduzierung des Effekts von Propionat auf die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration um etwa 40 % im Bereich der Kryptenoberfläche, wohingegen eine Blockade der nikotinergen Acetylcholinrezeptoren mit Hexamethonium an der Kryptenoberfläche eine signifikante Hemmung der Propionat-Antwort zur Folge hatte. Die kombinierte Hemmung von muskarinergen und nikotinergen Rezeptoren führte zu einer signifikanten Hemmung der Propionat-Antwort im Fundusbereich der Krypte (Tab. 3.5 und Abb. 3.20).

Dass der Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nur teilweise durch Antagonisten cholinergere Rezeptoren zu hemmen ist (Tab. 3.5 und Abb. 3.20), erklärt sich über die Art und Weise, wie kurzkettige Fettsäuren von Kolonepithelzellen erkannt werden. Die Rezeptoren für kurzkettige Fettsäuren, GPR41 und GPR43, sind typische  $\text{G}_q$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren (Yajima et al. 2011b), deren Stimulation selbst zu einem Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt, was wiederum die Antwort auf das parakrin freigesetzte Acetylcholin teilweise überdeckt. Dennoch zeigen diese Ergebnisse, dass das epitheliale Acetylcholin seine Wirkung sowohl über muskarinerge als auch über nikotinerge Rezeptoren vermittelt. Diese Befunde konnten in  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Experimenten an der humanen Kolonepithelzelllinie HT29/B6 bestätigt werden (Abb. 3.21).

## 4.2 Epitheliale nikotinerge Rezeptoren

### 4.2.1 Nikotinrezeptor-Untereinheiten im Kolonepithel

In der vorliegenden Arbeit am Kolonepithel der Ratte wurde die Expression aller bisher bei Säugetieren bekannten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der nikotinergen Acetylcholinrezeptoren mittels RT-PCR untersucht. Auf eine immunhistochemische Untersuchung wurde verzichtet, da der größte Teil der kommerziell verfügbaren Antikörper gegen nikotinerge Acetylcholinrezeptoren unspezifisch bindet (Moser et al. 2007, Weitz 2012). In isolierten Krypten konnten die Untereinheiten  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 10$  und  $\beta 4$  nachgewiesen werden (Abb. 3.22). Für die  $\alpha 9$ -Untereinheit gelang weder ein Nachweis im Referenzgewebe noch im Kolonepithel. Mikulski (2010) beschrieb ebenfalls Probleme mit der Amplifizierung der  $\alpha 9$ -Untereinheit in Alveolarmakrophagen der Ratte. Ihm gelang der Nachweis dieser Untereinheit nur, wenn ein spezielles Amplifizierungs-Kit, das Superscript II-Kit (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland), zur cDNA-Synthese verwendet wurde (für die Diskussion möglicher Gründe siehe Mikulski 2010). Doch selbst bei einer cDNA-Synthese mithilfe dieses Kits konnte ich die  $\alpha 9$ -mRNA weder in isolierten Krypten noch in zahlreichen anderen Geweben, von welchen eine Expression der  $\alpha 9$ -Untereinheit beschrieben ist (Haut, Urothel), detektieren. Auch die Verwendung verschiedener Primer brachte kein positives Ergebnis. Über die möglichen Gründe kann nur spekuliert werden. Möglicherweise ist die mRNA für diese nikotinerge Rezeptoruntereinheit sehr instabil und degradiert aus diesem Grund sehr schnell. Oder die  $\alpha 9$ -Untereinheit wird nicht regelmäßig (also nicht in allen Zellen oder nicht zu jedem Zeitpunkt) exprimiert. Dies wurde für das Trachealepithel der Maus bereits dokumentiert, denn dort war die  $\alpha 9$ -Untereinheit nur in 20 % der untersuchten Proben detektierbar (Weitz 2012).

Übereinstimmend mit meinen Ergebnissen am nativen Kolonepithel wurden verschiedene Nikotinrezeptor-Untereinheiten (u. a.  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ) in der humanen epithelialen Kolontumorzelllinie HT29 nachgewiesen (Summers et al 2003). Es konnte an dieser Zelllinie gezeigt werden, dass die Aktivierung von nikotinergen Acetylcholinrezeptoren eine Freisetzung von Zytokinen bewirkt (Summers et al. 2003) und die Zellproliferation beeinflusst (Wong et al. 2007).



Nikotinrezeptoren kommen in zahlreichen anderen Epithelien vor. So sind in humanen Keratinozyten verschiedene Untereinheiten der Nikotinrezeptoren beschrieben ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\beta 4$ ; Kurzen et al. 2007). Für die Haut konnte eine Beteiligung dieser Rezeptoren an der Regulation verschiedener Zellfunktionen wie Proliferation, Differenzierung, Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, Adhäsion und Apoptose gezeigt werden (Kurzen et al. 2007).

### 4.2.2 Funktionelle Charakterisierung der nAChR im Kolonepithel

Um zu untersuchen, welche Wirkung eine Aktivierung der epithelialen Nikotinrezeptoren auf Transportprozesse am Kolonepithel der Ratte hat, wurden Ussingkammer-Versuche durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass Dimethylphenylpiperazinium (DMPP), ein nikotinerger Agonist (Tapper und Lewand 1981), einen transienten Anstieg des  $I_{sc}$  induziert (Abb. 3.23). Die Versuche wurden an Kolonmukosa-Präparaten durchgeführt, d. h. die Neurone des Plexus submucosus und des Plexus myentericus waren entfernt worden. Um eine Wirkung von DMPP auf verbliebene enterische Neurone des Plexus mucosus zu verhindern, wurden die Versuche in Anwesenheit des Neurotoxins Tetrodotoxin durchgeführt, welches die Weiterleitung von Aktionspotentialen unterdrückt (Catterall 1980). Der DMPP-induzierte Anstieg des  $I_{sc}$  wurde durch eine Prä-Inkubation mit Hexamethonium, einem nikotinergen Antagonisten, signifikant gehemmt (Abb. 3.23). Der klassische Agonist nikotinerger Acetylcholinrezeptoren, Nikotin, verursachte ebenfalls einen konzentrationsabhängigen Anstieg des  $I_{sc}$  an Mukosa-Präparaten des distalen Kolons (Abb. 3.24). Dieser Anstieg des Kurzschlussstromes war getragen von einer von extrazellulärem  $Ca^{2+}$  abhängigen  $Cl^-$ -Sekretion (Abb. 3.25). Nikotinerge Acetylcholinrezeptoren sind ionotrope Rezeptoren, die nach ihrer Aktivierung den Einstrom von Kationen, wie z. B.  $Na^+$  oder  $Ca^{2+}$  in die Zelle vermitteln. Ein Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration löst wiederum, vermittelt durch Öffnen von  $Ca^{2+}$ -abhängigen  $K^+$ - und  $Cl^-$ -Kanälen, eine  $Cl^-$ -Sekretion aus (siehe z. B. Diener und Schultheiss 2002), was gut zu der beobachteten  $Ca^{2+}$ -Abhängigkeit des Nikotineffektes passt.

Da einer der klassischen intrazellulären Signalwege, bei dem  $\text{Ca}^{2+}$  eine zentrale Rolle spielt, der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-Weg ist, wurden Versuche mit den Calmodulin-Antagonisten Trifluoperazin (Kleene 1994) und Calmidazolium (Adkins et al. 2000) durchgeführt. Sowohl die Inkubation der Kolonmukosa mit Trifluoperazin als auch mit Calmidazolium führte zu einer signifikanten Hemmung der Nikotin-Antwort (Abb. 3.25). Calmodulin scheint also bei der Induktion einer  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{Cl}^-$ -Sekretion durch Nikotin eine wichtige Rolle zuzukommen, möglicherweise dadurch, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit mancher  $\text{K}^+$ -Kanäle nicht auf eine direkte Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an das Kanalprotein zurückgeht, sondern durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Phosphorylierung vermittelt wird (Kong et al. 2000).

Die in dieser Arbeit detektierten Nikotinrezeptor-Untereinheiten ermöglichen verschiedene potentiell mögliche Kombinationen dieser Untereinheiten zu funktionalen Nikotinrezeptoren. Denkbar wären z. B. Homopentamere aus  $\alpha 7$ -Untereinheiten oder Heteropentamere aus  $\alpha 2\beta 4$ ,  $\alpha 4\beta 4$  und  $\alpha 5\alpha 7\beta 4$ . Um die funktionelle Bedeutung der exprimierten Untereinheiten für das Kolonepithel zu untersuchen, wurden Experimente mit selektiven Antagonisten spezieller Untereinheiten durchgeführt (Bader und Diener, zur Publikation eingereicht). Hierbei konnte gezeigt werden, dass eine Prä-Inkubation von Mukosapräparaten sowohl mit  $\alpha$ -Bungarotoxin, einem Inhibitor von homomeren  $\alpha 7$ - und  $\alpha 9$ -Rezeptoren, als auch mit Dihydro- $\beta$ -erythroidin (Dh $\beta$ E), einem Inhibitor von  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 4$  und  $\alpha 7$  Nikotinrezeptoren (Übersicht zu den Antagonisten bei Wonnacott und Barik 2007), keinen Einfluss auf den Nikotin-induzierten Anstieg des  $I_{sc}$  hat. Im Gegensatz dazu bewirkte eine Prä-Inkubation des Gewebes mit Strychnin, das ist ein Antagonist von  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9/\alpha 10$  Rezeptoren (Wonnacott und Barik 2007), oder mit Atropin (25  $\mu\text{mol/l}$ ), welches in hohen Konzentrationen u. a.  $\alpha 3\beta 2$ ,  $\alpha 3\beta 4$ ,  $\alpha 4\beta 2$ ,  $\alpha 4\beta 4$  Rezeptoren blockiert (Parker et al. 2003), eine signifikante Hemmung der Nikotin-Antwort (Bader und Diener, zur Publikation eingereicht). Fasst man diese Daten mit den exprimierten Untereinheiten (Abb. 3.22) zusammen, so sind verschiedene Kombinationen von funktionellen Strychnin-sensitiven (z. B.  $\alpha 10^*$ ; \* steht für Kombination mit beliebigen anderen Untereinheiten in der IUPHAR-Nomenklatur der Nikotinrezeptoren; Lukas et al. 1999) und Atropin-sensitiven (z. B.  $\alpha 4\beta 4$ ) epithelialen Nikotinrezeptoren möglich.

### 4.3 Ungewöhnliche Agonisten an cholinergen Rezeptoren

#### 4.3.1 Cholin

Cholin wird bei cholinergen Signalübertragungssystemen im Allgemeinen lediglich als Vorstufe zur Synthese von Acetylcholin bzw. als Abbauprodukt, das bei der Acetylcholinesterasereaktion entsteht, betrachtet. Es ist aber bekannt, dass Cholin mit nikotinergen Acetylcholinrezeptoren interagieren kann. Einerseits ist Cholin als Agonist an nikotinergen Acetylcholinrezeptoren beschrieben, so z. B. an  $\alpha 7$ -Nikotinrezeptoren in Neuronen der Ratte oder als partieller Agonist an  $\alpha 3\alpha 4^*$ -Nikotinrezeptoren (Alkondon et al. 1997), andererseits wirkt es an  $\alpha 4\beta 4^*$ -nikotinergen Acetylcholinrezeptoren als Antagonist (Alkondon und Albuquerque 2006). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Cholin auf den Ionentransport am Kolonepithel der Ratte untersucht.

Aufgrund der bekannten neuronalen Wirkungen von Cholin (Alkondon et al. 1997) wurden die Ussingkammer-Experimente mit Mukosa-Submukosa-Präparaten, also mit intakter Innervation des Kolonepithels durch den Plexus submucosus, durchgeführt, um auch eventuelle Wirkungen von Cholin am enterischen Nervensystem erfassen zu können. Dabei wurde beobachtet, dass Cholin einen konzentrationsabhängigen Anstieg des  $I_{sc}$  am distalen Kolon der Ratte auslöst (Abb. 3.26 und Abb. 3.27, linke Seite). Eine Konzentration von  $10^{-3}$  mol/l bewirkte bereits einen leichten Anstieg des  $I_{sc}$ , eine maximale Reaktion wurde mit  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/l induziert (Abb. 3.26). Weitere Versuche ergaben, dass der Anstieg des  $I_{sc}$  von einer Sekretion von  $Cl^-$ -Ionen getragen wird und dass diese gegenüber dem Neurotoxin Tetrodotoxin resistent ist (Tab. 3.6). Während eine Vorbehandlung des Gewebes mit dem nikotinergen Antagonisten Hexamethonium keinen Effekt auf die Cholin-Antwort hatte, konnte diese durch eine Prä-Inkubation mit dem muskarinergen Antagonisten Atropin signifikant gehemmt werden (Tab. 3.6 und Abb. 3.27, rechte Seite).

Da am Kolonepithel M1 und M3 muskarinerge Acetylcholinrezeptoren beschrieben sind (Lindqvist et al. 1998, Haberberger et al. 2006, Khan et al. 2013), wurde der Effekt von Cholin auf das Kolonepithel in Gegenwart von selektiven M1- oder M3-Antagonisten untersucht um zu überprüfen, welcher der beiden Rezeptorsubtypen die Cholin-Antwort vermittelt.

Eine Blockade der M1 muskarinergen Acetylcholinrezeptoren mit Telenzepin oder Pirenzepin verringerte den Cholin-induzierten  $I_{sc}$ -Anstieg um mindestens 50 %, jedoch erwies sich dieser Effekt als statistisch nicht signifikant (Tab. 3.6). Bei einer Blockade der M3 muskarinergen Acetylcholinrezeptoren mit Darifenacin oder J104129 war die Cholin-Antwort hingegen signifikant gehemmt (Tab. 3.6).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Cholin epitheliale muskarinerge Acetylcholinrezeptoren aktiviert, insbesondere den M3 Muskarinezeptor, was zu einer  $Cl^-$ -Sekretion führt. Eine Beteiligung des enterischen Nervensystems an der Cholin-Antwort kann ausgeschlossen werden. Dieser Befund war zunächst überraschend, da für Cholin in der Hauptsache eine Wirkung als Agonist bzw. Antagonist an nikotinergen Acetylcholinrezeptoren bekannt ist (siehe oben). In der Literatur ist für Cholin jedoch zumindest am Herzen auch eine Stimulation von M3 muskarinergen Acetylcholinrezeptoren auf atrialen Myocyten des Meerschweinchens und des Hundes beschrieben (Shi et al. 1998, Shi et al. 1999). Die physiologische Relevanz für eine direkte Stimulation von muskarinergen Acetylcholinrezeptoren durch Cholin, dem Spaltprodukt von Acetylcholin, ist als gering einzuschätzen, denn es werden Konzentrationen im millimolaren Bereich benötigt um einen Anstieg des  $I_{sc}$  zu induzieren. Darüber hinaus ist dieser Anstieg verglichen mit Cholinestern (Abb. 3.28) nur gering, weshalb man vermuten kann, dass Cholin nur als partieller Agonist an den epithelialen Muskarinrezeptoren wirksam ist. Außerdem bleibt zu bedenken, dass die physiologische Plasmakonzentration von Cholin beim Menschen ungefähr 10  $\mu\text{mol/l}$  beträgt (Zeisel 2000). Deshalb ist es sehr unwahrscheinlich, dass in vivo millimolare Konzentrationen erreicht werden, selbst wenn die lokale Cholinkonzentration durch Spaltung von Acetylcholin kurzzeitig höher sein kann als der Plasmaspiegel. Viel wahrscheinlicher ist, dass Cholin als Modulator an epithelialen muskarinergen Acetylcholinrezeptoren wirksam ist. Solch eine modulatorische Funktion von niedrigen Cholinkonzentrationen wird an nikotinergen ACh-Rezeptoren im Gehirn der Ratte angenommen, denn physiologische Konzentrationen an Cholin führen zu einer Desensitivierung des  $\alpha 7$ -Nikotinrezeptors (Alkondon et al. 1997). Da ich am Kolonepithel der Ratte ebenfalls eine Desensitivierung nach wiederholter Zugabe von Cholin beobachten konnte (Daten nicht gezeigt), scheint eine vergleichbare Funktion wie im Gehirn sehr gut möglich zu sein.

#### 4.3.2 Butyrylcholin und Propionylcholin

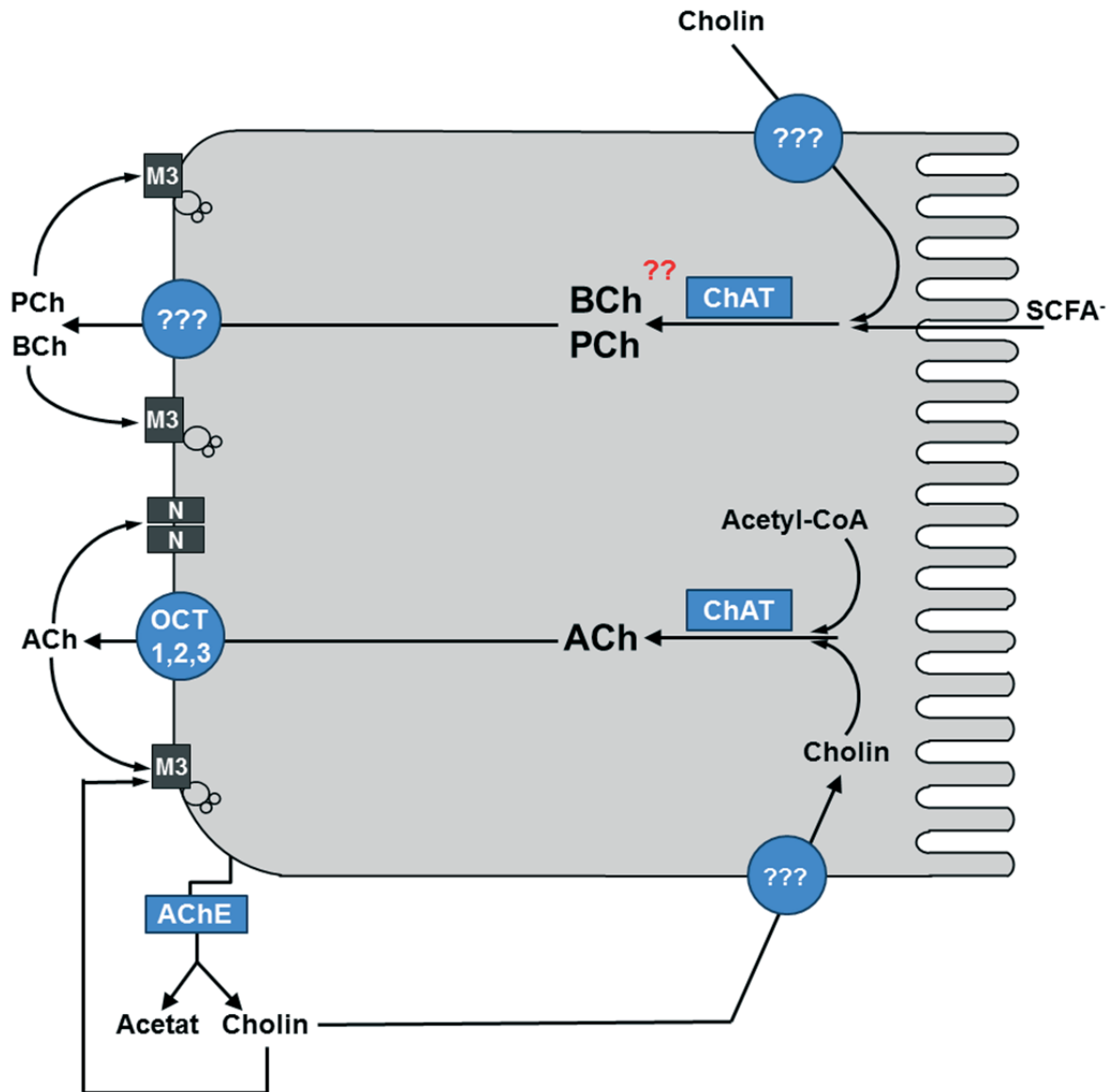
Acetylcholin wird aus den Substraten Cholin und Acetyl-CoA durch die Cholinacetyltransferase (ChAT) synthetisiert, die von Kolonepithelzellen exprimiert wird (siehe Kapitel 3.1.2 und Klapproth et al. 1997). Am Gehirn der Ratte konnte gezeigt werden, dass die Cholinacetyltransferase dieselbe Affinität für Acetyl-CoA, Propionyl-CoA und Butyryl-CoA aufweist (Rossier 1977), weshalb angenommen wird, dass dieses Enzym auch an der Synthese von Butyrylcholin und Propionylcholin beteiligt ist (Rossier 1977). Das Kolonepithel ist durch die bakterielle Fermentation von Strukturkohlenhydraten permanent hohen Konzentration kurzkettiger Fettsäuren ausgesetzt (Binder 2010). Die Gesamtkonzentration an Fettsäuren im Kolonlumen beträgt etwa 100 mmol/l (Bugaut 1987), wovon Acetat, Butyrat und Propionat den Hauptanteil ausmachen (Charney et al. 1998).

Da durch diese Besonderheit, sprich den permanenten Kontakt der Enterozyten mit den im Kolonlumen produzierten kurzkettigen Fettsäuren, eine Synthese von anderen Cholinestern außer Acetylcholin, nämlich Propionylcholin und Butyrylcholin, im Kolonepithel durchaus möglich wäre, habe ich untersucht, ob diese beiden atypischen Cholinester als Agonisten an epithelialen Acetylcholinrezeptoren wirksam sind. Tatsächlich induzierte sowohl Butyrylcholin als auch Propionylcholin einen konzentrationsabhängigen Anstieg des  $I_{sc}$  (Abb. 3.28) am distalen Kolon. Da die Amplitude des  $I_{sc}$ -Anstiegs, der durch diese beiden Ester induziert wird, vergleichbar ist mit dem Effekt, den Acetylcholin oder der Cholinrezeptor-Agonist Carbachol hervorrufen (Strabel und Diener 1995), wirken Butyrylcholin und Propionylcholin offenkundig als volle Agonisten an den entsprechenden Acetylcholinrezeptoren. Der Anstieg des  $I_{sc}$  war für sowohl bei Butyrylcholin als auch bei Propionylcholin resistent gegenüber einer Vorbehandlung mit Hexamethonium, jedoch durch Atropin signifikant hemmbar (Tab. 3.7). Somit konnte gezeigt werden, dass Butyrylcholin und Propionylcholin als Agonisten an muskarinergen Acetylcholinrezeptoren am distalen Kolon wirksam sind. Ob sie tatsächlich, und wenn ja in welchem Ausmaß, physiologischerweise im Kolonepithel gebildet werden, bedarf weiterer Untersuchungen.

### 4.4 Fazit

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die cholinerge Regulation des intestinalen Ionentransports in der Kolonmukosa sehr viel komplexer ist als ursprünglich angenommen. Acetylcholin, das sowohl aus enterischen Neuronen (Harrington et al. 2010) als auch aus dem Kolonepithel freigesetzt wird, moduliert die Anionensekretion über muskarinerge und nikotinerge Acetylcholinrezeptoren. Darüber hinaus können auch die möglicherweise im Kolonepithel durch die Cholinacetyltransferase synthetisierten atypischen Cholinester Butyrylcholin und Propionylcholin und sogar Cholin selbst mit muskarinergen Acetylcholinrezeptoren interagieren (Abb. 4.1).

Das cholinerge System des Kolonepithels ist Teil des allgemeinen non-neuronalen cholinergen Systems, das in vielen weiteren Zellen mit Barriere- oder Abwehrfunktion exprimiert wird. Acetylcholin aus non-neuronalen Zellen fungiert als autokriner oder parakriner Mediator, der in die Modulation zahlreicher Zellfunktionen involviert ist. So beeinflusst epitheliales Acetylcholin u. a. die Zelldifferenzierung, die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, die Wundheilung und die Proliferation der Zellen (Wessler und Kirkpatrick 2008). Ihm scheint also eine wesentliche Rolle zu zukommen bei der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion des Gesamtorganismus.



**Abb. 4.1: Vorstellung des non-neuronalen cholinergen Systems in der Kolonepithelzelle**

ChAT = Cholinacetyltransferase, OCT1, 2, 3 = Organischer Kationentransporter 1, 2 oder 3, ACh = Acetylcholin, BCh = Butyrylcholin, PCh = Propionylcholin, M3 = muskarinerges Acetylcholinrezeptor Subtyp M3, N= nikotinerges Acetylcholinrezeptor, SCFA<sup>-</sup> = kurzkettige Fettsäure (entweder Propionat oder Butyrat), AChE=Acetylcholinesterase

## 5 Zusammenfassung

Acetylcholin ist nicht nur ein Neurotransmitter, sondern wird auch in einer Reihe von nicht-neuronalen Zellen, v. a. solchen mit Barriere- oder Abwehrfunktion, gefunden. Zum Beispiel wird das Schlüsselenzym für die Acetylcholinsynthese, die Cholinacetyltransferase (ChAT), bei verschiedenen Säugern vom Kolonepithel exprimiert. Diese Zellen setzen, bei mukosaler Stimulation durch Propionat, Acetylcholin nach basolateral frei. Propionat ist eine kurzkettige Fettsäure, die physiologischerweise im Dickdarmlumen durch die bakterielle Fermentation von Strukturkohlenhydraten gebildet wird. Die Folge der Acetylcholinfreisetzung ist die Auslösung einer Anionensekretion, die in Ussingkammer-Experimenten als Anstieg des Kurzschlussstroms ( $I_{sc}$ ) erfasst werden kann. Bislang ist unklar, wie Acetylcholin vom Kolonepithel gebildet und freigesetzt wird. Deshalb war ein Ziel dieser Arbeit, die Transporter und Enzyme des non-neuronalen cholinergen Systems am distalen Kolon der Ratte zu identifizieren und funktionell zu charakterisieren. Außerdem sollte der Frage nachgegangen werden, ob parakrin wirkendes Acetylcholin seine Effekte am Epithel nur über die bereits dort beschriebenen muskarinergen Rezeptoren entfaltet oder ob auch nikotinerge Rezeptoren daran beteiligt sind.

Immunohistochemische Markierungen und RT-PCR-Experimente zeigten die Expression des hochaffinen Cholintransporters (CHT1), der ChAT, der Carnitinacetyltransferase (CarAT), des vesikulären Acetylcholintransporters (VACHT) und der drei Isoformen der organischen Kationentransporter (OCT 1 - 3) im Kolonepithel der Ratte. Im Unterschied zur Blockade der ChAT mittels Bromoacetylcholin hatte eine Inhibition der CarAT mit Mildronat keine hemmende Wirkung auf den durch Propionat ausgelösten Anstieg des  $I_{sc}$ , sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Hauptsyntheseleistung für die Acetylcholinbildung durch die ChAT getragen wird. Obwohl die Expression des VACHT auf Protein- und mRNA-Ebene im Kolonepithel nachweisbar war, spielt dieser Transporter keine Rolle für die epitheliale Acetylcholinfreisetzung wie entsprechende Versuche mit Vesamicol, einem Inhibitor des VACHT belegen, wohingegen eine OCT-Blockade die epitheliale Acetylcholinfreisetzung hemmt.



An Epithelzellen (isolierte Kolonkrypten von der Ratte und HT29/B6-Zellen), die mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Farbstoff Fura-2 aufgeladen waren, zeigte sich, dass Propionat einen Anstieg der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration hervorruft, der sich durch eine Kombination von Atropin und Hexamethonium hemmen ließ, während die Vorbehandlung nur mit Atropin oder nur mit Hexamethonium nicht oder deutlich schwächer wirksam war. Dies deutet auf eine Vermittlung des Effekts von parakrin freigesetztem Acetylcholin sowohl durch muskarinerge als auch durch nikotinerge Acetylcholinrezeptoren am Epithel hin.

In der Tat konnte durch zwei verschiedene nikotinische Agonisten (DMPP, Nikotin) eine Tetrodotoxin-resistente Anionsekretion an der Kolonmukosa ausgelöst werden. Die Antwort ließ sich durch den nikotinerge Rezeptorantagonisten Hexamethonium unterdrücken. RT-PCR Experimente zeigten die Expression verschiedener Untereinheiten von nikotinerge Rezeptoren, nämlich  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 10$  und  $\beta 4$  im Kolonepithel.

In Ussingkammer-Experimenten wurde die Wirkung des potentiell nikotinerg wirkenden Cholins auf den Ionentransport untersucht. Es stellt ein Endprodukt der Hydrolyse durch die Acetylcholinesterase dar, welche histochemisch am Kolonepithel nachweisbar war. Cholin induzierte eine konzentrationsabhängige, Tetrodotoxin-resistente Chloridsekretion. Diese war hemmbar durch Atropin und M3-Rezeptorblocker (und weniger gut auch durch Blockade der M1-Rezeptoren), nicht jedoch durch Hexamethonium. Ähnliche Wirkungen zeigten Butyrylcholin und Propionylcholin, zwei weitere Ester von Cholin. Aufgrund einer hohen Konzentration kurzkettiger Fettsäuren im Kolon können die genannten Ester im Kolonepithel gebildet werden, da ChAT neben Acetyl-CoA auch Butyryl-CoA und Propionyl-CoA als Substrat akzeptiert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die cholinerge Regulation des Ionentransports am Kolon, von der man bisher annahm, dass sie lediglich durch Acetylcholin aus Neuronen des Plexus submucosus, das dann an epitheliale muskarinerge Rezeptoren bindet, getragen wird, wesentlich komplexer ist als bisher bekannt.

## 6 Summary

Acetylcholine is not only a neurotransmitter, but is also found in non-neuronal cells with barrier or immune functions. For example, the enzyme choline acetyltransferase (ChAT), which catalyses acetylcholine synthesis, is expressed by the colonic epithelium of different mammals. These cells release acetylcholine across the basolateral membrane after luminal exposure to propionate, a short-chain fatty acid physiologically produced during the fermentation of carbohydrates in the colonic lumen. The functional consequence is an induction of anion secretion, measurable as increase in short-circuit current ( $I_{sc}$ ) in Ussing chamber experiments. It is unclear how acetylcholine is produced and released by colonic epithelial cells. Therefore, the aim of the present study was the identification and functional characterization of transporters and enzymes in the cholinergic system of rat colonic epithelium. Furthermore, the question should be answered whether acetylcholine exerts its epithelial effect solely via muscarinic receptors at the epithelium or whether, in addition, nicotinic receptors are involved.

Immunohistochemical stainings as well as RT-PCR revealed the expression of high-affinity choline transporter (CHT1), ChAT, carnitine acetyltransferase (CarAT), vesicular acetylcholine transporter (VACHT), and organic cation transporters (OCT 1, 2, 3) in rat colonic epithelium. In contrast to blockade of ChAT with bromoacetylcholine, inhibition of CarAT with mildronate did not inhibit the propionate-induced increase in  $I_{sc}$ , suggesting a predominant synthesis of epithelial acetylcholine by ChAT. Although being expressed, blockade of VACHT with vesamicol was ineffective, whereas inhibition of OCTs with omeprazole and corticosterone inhibited propionate-induced  $I_{sc}$  and the release of acetylcholine into the basolateral compartment.

At fura-2 loaded epithelial cells (isolated rat colonic crypts and HT29/B6 cells) propionate induced an increase in the cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration, which was inhibited by a combination of atropine and hexamethonium, i.e. a combination of muscarinic and nicotinic antagonists suggesting a functional role of both receptor types in this epithelium. Indeed, two nicotinic agonists, dimethylphenylpiperazinium and nicotine, induced a tetrodotoxin-resistant anion secretion leading to an increase in

$I_{sc}$  across colonic mucosa. The response was suppressed by the nicotinic receptor antagonist hexamethonium. RT-PCR experiments revealed the expression of different nicotinic receptor subunits, i.e.  $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 10$ , and  $\beta 4$  in colonic epithelium.

Choline, the product of acetylcholine hydrolysis by acetylcholinesterase, is known for its affinity to several nicotinic receptor subtypes. Since a strong acetylcholinesterase activity has been detected by histochemical staining in colonic epithelium, the effect of choline on  $I_{sc}$  was examined. Choline induced a concentration-dependent, tetrodotoxin-resistant chloride secretion which was, however, insensitive to hexamethonium, but was inhibited by atropine. Experiments with specific inhibitors of M1 and M3 receptors revealed that the secretion evoked by choline was mainly due to a stimulation of epithelial M3 receptors. Furthermore, also other esters of choline, i.e. butyrylcholine and propionylcholine, which can be produced by choline acetyltransferase in the presence of the respective short-chain fatty acids, stimulated epithelial muscarinic receptors.

Thus the cholinergic regulation of colonic ion transport, which was up to now solely explained by cholinergic submucosal neurons stimulating epithelial muscarinic acetylcholine receptors, is much more complex than previously assumed.

## 7 Verzeichnisse

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AChR	Acetylcholinrezeptor
AM	Acetoxymethylester
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-3',5'-triphosphat
BCh	Butyrylcholin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BuChE	Butyrylcholinesterase
Butyryl-CoA	Butyryl- Coenzym A
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CarAT	Carnitinacetyltransferase
CCD	charge coupled device
CCh	Carbachol
cDNA	komplementäre DNA
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
ChAT	Cholinacetyltransferase
CHT1	hochaffiner Cholintransporter
CPA	Cyclopiazonsäure
CTL	Choline transporter-like protein
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
Dh $\beta$ E	Dihydro- $\beta$ -erythroidin
DMPP	Dimethylphenylpiperazinium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fab	Antigen-bindende Region eines Antikörpers
FBS	Fetales Kälberserum
Fc	Kristalline Region eines Antikörpers
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gew/Vol	Gewichtsanteil (Gewicht/Volumen)
GPR41	G-Protein gekoppelter Rezeptor 41 (Rezeptor für kurzkettige Fettsäuren)
GPR43	G-Protein gekoppelter Rezeptor 43 (Rezeptor für kurzkettige Fettsäuren)
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
G <sub>t</sub>	Gewebeleitfähigkeit
HBSS	Hanks balanced salt solution
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	High-performance liquid chromatography
HT29/B6	Humane Kolonkarzinomzelllinie
IgG	Immunglobulin G
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP <sub>3</sub> R	Inositol-1,4,5-trisphosphatrezeptor
I <sub>sc</sub>	Kurzschlussstrom
IUPHAR	International Union of Pharmacology
Kap.	Kapitel
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
KGluc	Kaliumgluconat
mAChR	muskarinischer Acetylcholinrezeptor
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
nAChR	nikotinerger Acetylcholinrezeptor
NaGluc	Natriumgluconat
NDS	Eselserum
NKCC1	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup> -Cotransporter

OCT	Organischer Kationentransporter
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PB	Phosphatpuffer
PCh	Propionylcholin
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCR(TD)	Touchdown-PCR
Pd	Transepitheliale Potentialdifferenz
PFA	Paraformaldehyd
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC $\beta$	Phospholipase C- $\beta$
Propionyl-CoA	Propionyl-Coenzym A
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Messfeld (region of interest)
R <sub>t</sub>	Gewebewiderstand
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SCFA	Kurzkettige Fettsäuren
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SERCA	Sarkoplasmatische-endoplasmatische Retikulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
siRNA	Small interfering RNA
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Trisacetat-Puffer
TM	Transmembrane Domäne
T <sub>m</sub>	Primer-Schmelztemperatur
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTX	Tetrodotoxin
VACHT	Vesikulärer Acetylcholintransporter
Vol/Vol	Volumenanteil (Volumen/Volumen)
$\Delta$	Änderung eines Parameters

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Acetylcholin-Synthesesyklus an einer cholinergen Nervenendigung.....	7
Abb. 1.2:	Acetylcholin-Synthesesyklus in einer non-neuronalen Zelle.....	8
Abb. 1.3:	Organisation und Struktur der nikotinergen Acetylcholinrezeptoren ....	11
Abb. 1.4:	Schematische Darstellung eines muskarinergen Acetylcholinrezeptors	13
Abb. 1.5:	Signalkaskade der muskarinergen Acetylcholinrezeptoren .....	15
Abb. 1.6:	Schematische Darstellung der Kolonwand unter Lupenvergrößerung...	17
Abb. 1.7:	Halbschematische Darstellung einer Lieberkühnschen Krypte.....	19
Abb. 1.8:	Schematische Darstellung der wichtigsten Mechanismen zur Chloridsekretion .....	20
Abb. 1.9:	Möglicher Acetylcholin-Synthesesyklus in einer Kolonepithelzelle....	24
Abb. 2.1:	Herstellung eines Mukosapräparates:.....	34
Abb. 2.2:	Einzelne Krypte, isoliert aus dem distalen Kolon einer Ratte.....	35
Abb. 2.3:	Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzmarkierung.....	38
Abb. 2.4:	Schematische Skizze eines Plexigashalters für die Gewebefixierung und –einbettung .....	40
Abb. 2.5:	Mechanismus der Karnovsky-Reaktion .....	45
Abb. 2.6:	Ablauf einer typischen PCR-Reaktion .....	48
Abb. 2.7:	Schema einer modifizierten Ussingkammer.....	59
Abb. 2.8:	Ersatzschaltkreismodell von Ussing und Zerahn (1951) für ein Epithel	60
Abb. 2.9:	Schalbilder für (A) Open-circuit Modus und (B) Voltage-clamp Modus .....	61
Abb. 2.10:	Exzitationsspektren von Fura-2 bei verschiedenen $\text{Ca}^{2+}$ - Konzentrationen .....	65
Abb. 2.11:	A) Strukturformel von Fura-2, B) Strukturformel Fura-2 AM.....	66
Abb. 2.12:	Aufbau des $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Messstandes.....	67
Abb. 2.13:	Falschfarbendarstellung .....	69
Abb. 3.1:	Immunfluoreszenzmarkierung des CHT1 am distalen Kolon der Ratte	73
Abb. 3.2:	Agarosegele mit den PCR-Produkten für OCT1 - 3, CHT1 und VACHT .....	74
Abb. 3.3:	Depletions-Protokoll für die Ussingkammer-Versuche an Mukosapräparaten .....	77
Abb. 3.4:	Inhibierung des CHT1 durch Hemicholinium-3 .....	78
Abb. 3.5:	Acetylcholinfreisetzung in das serosale Kompartiment nach Stimulation mit Propionat.....	80
Abb. 3.6:	Immunfluoreszenzmarkierung der ChAT und der CarAT .....	82
Abb. 3.7:	Agarosegele mit den PCR-Produkten für ChAT und CarAT.....	83
Abb. 3.8:	Original-Kurvenverlauf der Ussingkammer-Versuche mit Bromoacetylcholin .....	85
Abb. 3.9:	Effekt der Blockade der CarAT auf den $I_{sc}$ am Kolonepithel.....	86
Abb. 3.10:	Immunfluoreszenzmarkierung des VACHT am distalen Kolon der Ratte.....	88
Abb. 3.11:	Agarosegele mit den PCR-Produkten für OCT1 - 3, CHT1 und VACHT .....	89
Abb. 3.12:	Effekt der Blockade des VACHT auf den $I_{sc}$ nach Zugabe von Propionat.....	90
Abb. 3.13.:	Immunfluoreszenzmarkierung der OCTs am distalen Kolon der Ratte	93

Abb. 3.14: Agarosegele mit den PCR-Produkten für OCT1 - 3, CHT1 und VACHT .....	94
Abb. 3.15: Einfluss der Blockade der OCTs auf den Propionat-induzierten $I_{sc}$ -Anstieg .....	96
Abb. 3.16: Propionat-induzierte Acetylcholinfreisetzung an Mukosapräparaten ....	99
Abb. 3.17: Nachweis der Cholinesterasen am Kolonepithel der Ratte.....	100
Abb. 3.18: Veränderung der zytosolischen $Ca^{2+}$ Konzentration durch Propionat..	101
Abb. 3.19: Einfluss von intrazellulärem und extrazellulärem $Ca^{2+}$ auf die Propionat-Antwort.....	103
Abb. 3.20: Vergleich der Propionat-Antwort der Kolonepithelzellen entlang der Kryptenachse .....	106
Abb. 3.21: Veränderung der zytosolischen $Ca^{2+}$ -Konzentration durch Propionat an HT29/B6-Zellen.....	108
Abb. 3.22: Agarosegele mit den PCR-Produkten der Untereinheiten der nikotinergen Acetylcholinrezeptoren .....	110
Abb. 3.23: Funktioneller Nachweis von nikotinergen Acetylcholinrezeptoren an der Kolonmukosa.....	112
Abb. 3.24: Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Nikotin.....	113
Abb. 3.25: Nikotin induziert eine $Ca^{2+}$ -abhängige $Cl^{-}$ -Sekretion.....	115
Abb. 3.26: Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Cholin.....	117
Abb. 3.27: Der Cholin-induzierte Anstieg des $I_{sc}$ kann durch Atropin gehemmt werden .....	119
Abb. 3.28: Konzentrations-Wirkungs-Kurven für Butyrylcholin und Propionylcholin .....	123
Abb. 4.1: Vorstellung des non-neuronalen cholinergen Systems in der Kolonepithelzelle.....	145



### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Verwendete Primärantikörper .....	41
Tab. 2.2:	Verwendeter Sekundärantikörper .....	41
Tab. 2.3:	Färbeprotokoll für die Immunfluoreszenzmarkierung. ....	42
Tab. 2.4:	Zusammensetzung des Primermixes für die cDNA-Synthese mit dem Tetro cDNA Synthesis Kit.....	51
Tab. 2.5:	Zusammensetzung des Primermixes für die cDNA-Synthese mit dem Superscript II cDNA Synthesis Kit .....	52
Tab. 2.6:	Sequenz der verwendeten Primer für Enzyme und Transporter des cholinergen Systems und für das Housekeeping-Gen GAPDH .....	53
Tab. 2.7:	Sequenzen der verwendeten Primer für die Untereinheiten der nikotinergen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) .....	54
Tab. 2.8:	Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes je Probe .....	55
Tab. 2.9:	Touchdown PCR Programm für OCT1, $\alpha 7$ , $\beta 1$ und $\beta 4$ .....	55
Tab. 2.10:	Touchdown PCR Programm für: CarAT, $\alpha 1$ , $\alpha 2$ , $\alpha 3$ , $\alpha 4$ , $\alpha 5$ , $\alpha 6$ , $\alpha 10$ , $\beta 2$ .....	56
Tab. 2.11:	Touchdown PCR Programm für: ChAT, OCT2, OCT3, VACHT, CHT1 .....	56
Tab. 3.1:	Effekt des CHT1-Inhibitors Hemicholinium-3 auf den $I_{sc}$ am Kolonepithel .....	78
Tab. 3.2:	Effekt der Blockade der ChAT und der CarAT auf den $I_{sc}$ am Kolonepithel .....	86
Tab. 3.3:	Effekt der Blockade des VACHT auf den $I_{sc}$ am Kolonepithel .....	91
Tab. 3.4:	Einfluss von Inhibitoren der OCTs auf den Propionat-induzierten $I_{sc}$ - Anstieg.....	97
Tab. 3.5:	Einfluss von Acetylcholinrezeptor-Antagonisten auf die Propionat- Antwort entlang der Kryptenachse .....	105
Tab. 3.6:	Cholin induziert eine TTX-resistente Chloridsekretion, die durch muskarinerge Acetylcholinrezeptoren vermittelt wird.....	121
Tab. 3.7:	Atropin hemmt den $I_{sc}$ -Anstieg nach Zugabe von Butyrylcholin und Propionylcholin .....	124

## 7.4 Literaturverzeichnis

- Adkins CE, Morris SA, De Smedt H, Sienaert I, Török K, Taylor CW** (2000)  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulin inhibits  $\text{Ca}^{2+}$  release mediated by type-1,-2 and-3 inositol trisphosphate receptors. *Biochem J* 345: 357-363
- Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, Rogers SW** (2009) Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews* 89: 73–120
- Alkondon M, Albuquerque EX** (2006) Subtype-specific inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by choline: a regulatory pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 318(1): 268–275
- Alkondon M, Pereira EF, Cortes WS, Maelicke A, Albuquerque EX** (1997) Choline is a selective agonist of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur J Neurosci* 9: 2734–2742
- Arvidsson U, Riedl M, Elde R, Meister B** (1997) Vesicular acetylcholine transporter (VACHT) protein: a novel and unique marker for cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems. *J Comp Neurol* 378: 454–467
- Barrett KE, Keely SJ** (2000) Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annu Rev Physiol* 62: 535–572
- Bayer G, Wense T** (1936) Über den Nachweis von Hormonen in einzelligen Tieren. *Pflügers Arch* 237(1):417–422
- Binder HJ** (2010) Role of colonic short-chain fatty acid transport in diarrhea. *Annu. Rev. Physiol* 72:297–313
- Böhme M, Diener M, Rummel W** (1991) Calcium- and cyclic-AMP-mediated secretory responses in isolated colonic crypts. *Pflügers Arch* 419:144–151
- Bugaut M** (1987) Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. *Comp Biochem Physiol B* 86: 439-472
- Cannon JG** (1994) Structure-activity aspects of hemicholinium-3 (HC-3) and its analogs and congeners. *Med Res Rev* 14: 505–531
- Catterall WA** (1980) Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20: 15–43
- Charney AN, Micic L, Egnor RW** (1998) Nonionic diffusion of short-chain fatty acids across rat colon. *Am J Physiol* 274: G518-24
- Comline RS** (1946) Synthesis of acetylcholine by non-nervous tissue. *J Physiol* 105: 6-7

- Dani JA** (2001) Overview of nicotinic receptors and their roles in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 49: 166-174
- Diener M, Egleme C, Rummel W** (1991) Phospholipase C-induced anion secretion and its interaction with carbachol in the rat colonic mucosa. *Eur J Pharmacol* 200: 267-276
- Diener M, Knobloch SF, Bridges RJ, Keilmann T, Rummel W** (1989a) Cholinergic-mediated secretion in the rat colon: neuronal and epithelial muscarinic responses. *Eur J Pharmacol* 168: 219-229
- Diener M, Mestres P, Bridges RJ, Rummel W** (1989b) Functional and morphological changes during electric field stimulation of rat colon descendens. In: *Nerves and the Gastrointestinal Tract*, MV Singer, H Goebell (Eds.), MTP Press, Lancaster Boston The Hague Dordrecht: 705-712
- Diener M, Schultheiss G** (2002) Ca<sup>2+</sup>-signaling in intestinal epithelial cells. *Curr Topics Pharmacol* 6: 163-169
- Dockray GJ** (2006) Gastrointestinal Hormones: Gastrin, Cholecystokinin, Somatostatin, and Ghrelin. In LR Johnson, KE Barret, FK Gishan, JL Merchant, HM Said, JD Wood (Eds.) *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 4th Ed., Burlington, Academic Press: 91-120
- Eglen RM** (2006) Muscarinic receptor subtypes in neuronal and non-neuronal cholinergic function. *Auton Autacoid Pharmacol* 26: 219-233
- Eiden LE** (1998) The cholinergic gene locus. *J Neurochem* 70: 2227-2240
- Erickson JD, Varoqui H, Schafer MK, Modi W, Diebler MF, Weihe E, Rand J, Eiden LE, Bonner TI, Usdin TB** (1994) Functional identification of a vesicular acetylcholine transporter and its expression from a "cholinergic" gene locus. *J Biol Chem* 269: 21929-21932
- Ewins AJ** (1914) Acetylcholine, a new active principle of ergot. *Biochem J* 8: 44-49
- Felder CC** (1995) Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *FASEB J* 9: 619-625
- Ferguson SM, Blakely RD** (2004) The choline transporter resurfaces: new roles for synaptic vesicles? *Mol Interv* 4: 22-37
- Florell SR, Coffin CM, Holden JA, Zimmermann JW, Gerwels JW, Summers BK, Jones DA, Leachman SA** (2001) Preservation of RNA for functional genomic studies: a multidisciplinary tumor bank protocol. *Mod Pathol* 14: 116-128

- Fucile S** (2004)  $\text{Ca}^{2+}$  permeability of nicotinic acetylcholine receptors. *Cell Calcium* 35: 1–8
- Galvan M, Boer R, Schudt C** (1989) Interaction of telenzepine with muscarinic receptors in mammalian sympathetic ganglia. *Eur J Pharmacol* 167: 1–10
- Glowatzki E, Wild K, Brandle U, Fakler G, Fakler B, Zenner HP, Ruppersberg JP** (1995) Cell-specific expression of the  $\alpha 9$  n-ACh receptor subunit in auditory hair cells revealed by single-cell RT-PCR. *Proc Biol Sci* 262: 141–147
- Goeger DE, Riley RT, Dorner JW, Cole RJ** (1988) Cyclopiazonic acid inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$ -transport ATPase in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles. *Biochem Pharmacol* 37: 978–981
- Gotti C, Clementi F** (2004) Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 74: 363–396
- Grando SA, Kawashima K, Wessler I** (2003) Introduction: The non-neuronal cholinergic system in humans. *Life Sci* 72: 2009–2012
- Greger R** (2000) Role of CFTR in the colon. *Annu Rev Physiol* 62: 467–491
- Greger R, Bleich M, Leipziger J, Ecke D, Mall M, Kunzelmann K** (1997) Regulation of ion transport in colonic crypts. *News Physiol Sci* 12: 62–66
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY** (1985) A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260: 3440–3450
- Gueorguiev VD, Zeman RJ, Hiremagalur B, Menezes A, Sabban EL** (1999) Differing temporal roles of  $\text{Ca}^{2+}$  and cAMP in nicotine-elicited elevation of tyrosine hydroxylase mRNA. *Am J Physiol* 276: C54–65
- Haberberger R, Schultheiss G, Diener M** (2006) Epithelial muscarinic M1 receptors contribute to carbachol-induced ion secretion in mouse colon. *Eur J Pharmacol* 530:229–233
- Haberberger RV, Bodenbenner M, Kummer W** (2000) Expression of the cholinergic gene locus in pulmonary arterial endothelial cells. *Histochem Cell Biol* 113: 379–387
- Haberberger RV, Pfeil U, Lips KS, Kummer W** (2002) Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the neuronal and non-neuronal cholinergic system of human and rat skin. *J Invest Dermatol* 119: 943–948
- Hanna-Mitchell AT, Beckel JM, Barbadora S, Kanai AJ, de Groat WC, Birder LA** (2007) Non-neuronal acetylcholine and urinary bladder urothelium. *Life Sci* 80: 2298–2302

- Harrington AM, Hutson JM, Southwell BR** (2010) Cholinergic neurotransmission and muscarinic receptors in the enteric nervous system. *Prog Histochem Cytochem* 44: 173–202
- Hartmann E, Kilbinger H** (1974) Occurrence of light-dependent acetylcholine concentrations in higher plants. *Experientia* 30: 1397–1398
- Haugland RP** (2005) Indicators for  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and other metal ions. In MTZ Spence (Ed.) *The Handbook. A guide to fluorescent probes and labeling technologies*, 10th Ed., Molecular Probes : 875–933
- Hayer-Zillgen M, Brüss M, Bönisch H** (2002) Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. *Br J Pharmacol* 136: 829–836
- Hecker A, Mikulski Z, Lips KS, Pfeil U, Zakrzewicz A, Wilker S, Hartmann P, Padberg W, Wessler I, Kummer W, Grau V** (2009) Pivotal Advance: Up-regulation of acetylcholine synthesis and paracrine cholinergic signaling in intravascular transplant leukocytes during rejection of rat renal allografts. *J Leukoc Biol* 86: 13–22
- Hennig B, Schultheiss G, Kunzelmann K, Diener M** (2008)  $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Cl}^-$  efflux at rat distal colonic epithelium. *J Membr Biol* 221: 61–72
- Hirota CL, McKay DM** (2006) Cholinergic regulation of epithelial ion transport in the mammalian intestine. *Br J Pharmacol* 149: 463–479
- Horiuchi Y, Kimura R, Kato N, Fujii T, Seki M, Endo T, Kato T, Kawashima K** (2003) Evolutional study on acetylcholine expression. *Life Sci* 72: 1745–1756
- Inazu M, Takeda H, Matsumiya T** (2005) Molecular and functional characterization of an  $\text{Na}^+$ -independent choline transporter in rat astrocytes. *J Neurochem* 94:1427–1437
- Jaudzems K, Kuka J, Gutsaits A, Zinovjevs K, Kalvinsh I, Liepinsh E, Liepinsh E, Dambrova M** (2009) Inhibition of carnitine acetyltransferase by mildronate, a regulator of energy metabolism. *J Enzyme Inhib Med Chem* 24: 1269–1275
- Jositsch G, Papadakis T, Haberberger RV, Wolff M, Wess J, Kummer W** (2009) Suitability of muscarinic acetylcholine receptor antibodies for immunohistochemistry evaluated on tissue sections of receptor gene-deficient mice. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 379: 389–395
- Kalamida D, Poulas K, Avramopoulou V, Fostieri E, Lagoumintzis G, Lazaridis K, Sideri A, Zouridakis M, Tzartos SJ** (2007) Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *FEBS J* 274(15): 3799–3845

- Kaplan MR, Mount DB, Delpire E** (1996) Molecular mechanisms of NaCl cotransport. *Annu Rev Physiol* 58: 649–668
- Karnovsky MJ, Roots L** (1964) A "direct-coloring" thiocholine method for cholinesterases. *J Histochem Cytochem* 12: 219–221
- Kawashima K, Misawa H, Moriwaki Y, Fujii YX, Fujii T, Horiuchi Y, Yamada T, Imanaka T, Kamekura M** (2007) Ubiquitous expression of acetylcholine and its biological functions in life forms without nervous systems. *Life Sci* 80: 2206–2209
- Khan, Md Rafiqul Islam, Anisuzzaman, Abu Syed Md, Semba S, Ma Y, Uwada J, Hayashi H, Suzuki Y, Takano T, Ikeuchi H, Uchino M, Maemoto A, Ushikubi F, Muramatsu I, Taniguchi T** (2013) M1 is a major subtype of muscarinic acetylcholine receptors on mouse colonic epithelial cells. *J Gastroenterol* 48: 885–896
- Klapproth H, Reinheimer T, Metzen J, Munch M, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Hohle KD, Schemann M, Racke K, Wessler I** (1997) Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 355: 515–523
- Kleene SJ** (1994) Inhibition of olfactory cyclic nucleotide-activated current by calmodulin antagonists. *Br J Pharmacol* 111: 469–472
- Köckerling A, Fromm M** (1993) Origin of cAMP-dependent Cl<sup>-</sup> secretion from both crypts and surface epithelia of rat intestine. *Am J Physiol* 264: C1294–301
- Köckerling A, Sorgenfrei D, Fromm M** (1993) Electrogenic Na<sup>+</sup> absorption of rat distal colon is confined to surface epithelium: a voltage-scanning study. *Am J Physiol* 264: C1285–93
- Koelle GB, Davis R, Diliberto EJ Jr, Koelle WA** (1974) Selective, near-total, irreversible inactivation of peripheral pseudocholinesterase and acetylcholinesterase in cats in vivo. *Biochem Pharmacol* 23: 175–188
- Koepsell H** (2013) The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. *Mol Aspects Med* 34: 413–435
- Koepsell H, Lips K, Volk C** (2007) Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res* 24: 1227–1251
- Kong ID, Koh SD, Bayguinov O, Sanders KM** (2000). Small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels are regulated by Ca<sup>2+</sup>-calmodulin-dependent protein kinase II in murine colonic myocytes. *J Physiol* 524: 331–337

- Korbie DJ, Mattick JS** (2008) Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc* 3: 1452–1456
- Kreusel KM, Fromm M, Schulzke JD, Hegel U** (1991) Cl<sup>-</sup> secretion in epithelial monolayers of mucus-forming human colon cells (HT-29/B6). *Am J Physiol* 261: C574-82
- Kummer W, Krasteva-Christ G** (2014) Non-neuronal cholinergic airway epithelium biology. *Curr Opin Pharmacol* 16C: 43–49
- Kummer W, Lips KS, Pfeil U** (2008) The epithelial cholinergic system of the airways. *Histochem Cell Biol* 130: 219–234
- Kummer W, Wiegand S, Akinci S, Wessler I, Schinkel AH, Wess J, Koepsell H, Haberberger RV, Lips KS** (2006) Role of acetylcholine and polyspecific cation transporters in serotonin-induced bronchoconstriction in the mouse. *Respir Res* 7:65
- Kurzen H, Wessler I, Kirkpatrick C, Kawashima K, Grando S** (2007) The Non-neuronal cholinergic system of human skin. *Horm Metab Res* 39: 125–135
- Lindqvist SM, Sharp P, Johnson IT, Satoh Y, Williams MR** (1998) Acetylcholine-induced calcium signaling along the rat colonic crypt axis. *Gastroenterology* 115: 1131–1143
- Lindström CG, Rosengren JE, Fork FT** (1979) Colon of the rat. An anatomic, histologic and radiographic investigation. *Acta Radiol Diagn* 20: 523-536
- Lindstrom J, Anand R, Peng X, Gerzanich V, Wang F, Li Y** (1995) Neuronal nicotinic receptor subtypes. *Ann N Y Acad Sci* 757: 100–116
- Lipkin M** (1985) Growth and development of gastrointestinal cells. *Annu Rev Physiol* 47: 175–197
- Lips KS, Brüggmann D, Pfeil U, Vollerthun R, Grando SA, Kummer W** (2005a) Nicotinic acetylcholine receptors in rat and human placenta. *Placenta* 26: 735–746
- Lips KS, Lührmann A, Tschernig T, Stoeger T, Alessandrini F, Grau V, Haberberger RV, Koepsell H, Pabst R, Kummer W** (2007a) Down-regulation of the non-neuronal acetylcholine synthesis and release machinery in acute allergic airway inflammation of rat and mouse. *Life Sci* 80: 2263–2269
- Lips KS, Pfeil U, Reiners K, Rimasch C, Kuchelmeister K, Braun-Dullaeus RC, Haberberger RV, Schmidt R, Kummer W** (2003) Expression of the high-affinity choline transporter CHT1 in rat and human arteries. *J Histochem Cytochem* 51: 1645–1654

- Lips KS, Volk C, Schmitt BM, Pfeil U, Arndt P, Miska D, Ermert L, Kummer W, Koepsell H** (2005b) Polyspecific cation transporters mediate luminal release of acetylcholine from bronchial epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33: 79–88.
- Lips KS, Wunsch J, Zarghooni S, Bschiepfer T, Schukowski K, Weidner W, Wessler I, Schwantes U, Koepsell H, Kummer W** (2007b) Acetylcholine and molecular components of its synthesis and release machinery in the urothelium. *Eur Urol* 51: 1042-1053
- Liu R, Mizuta M, Matsukura S** (2004) The expression and functional role of nicotinic acetylcholine receptors in rat adipocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 310: 52–58
- Loewi O** (1921) Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Arch* 189(1): 239–242
- Lukas RJ, Changeux JP, Le Novère N, Albuquerque EX, Balfour DJ, Berg DK, Bertrand D, Chiappinelli VA, Clarke PB, Collins AC, Dani JA, Grady SR, Kellar KJ, Lindstrom JM, Marks MJ, Quik M, Taylor PW, Wonnacott S** (1999) International Union of Pharmacology. XX. Current status of the nomenclature for nicotinic acetylcholine receptors and their subunits. *Pharmacol Rev* 51: 397-401
- Madden J, Mitchelson F** (1975) The interaction of hemicholinium-3 (HC-3) with cholinomimetics and atropine. *Eur J Pharmacol* 32: 17–29
- Michel V, Zongfei Y, Ramsubir S, Bakovic M** (2006) Choline transport for phospholipid synthesis. *Exp Biol Med* 231: 490–504
- Mikulski Z** (2010) Expression and role of serotonergic and nicotinic acetylcholine receptors in alveolar macrophages, 1. Aufl. Edition scientifique. VVB Lauferweiler, Giessen
- Mikulski Z, Hartmann P, Jositsch G, Zaslona Z, Lips KS, Pfeil U, Kurzen H, Lohmeyer J, Clauss WG, Grau V, Fronius M, Kummer W** (2010) Nicotinic receptors on rat alveolar macrophages dampen ATP-induced increase in cytosolic calcium concentration. *Respir Res* 11: 133
- Millar NS, Gotti C** (2009) Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 56: 237–246
- Misawa H, Takahashi R, Deguchi T** (1995) Coordinate expression of vesicular acetylcholine transporter and choline acetyltransferase in sympathetic superior cervical neurones. *Neuroreport* 6: 965–968



- Mishina M, Takai T, Imoto K, Noda M, Takahashi T, Numa S** (1986) Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptors. *Nature* 22: 406–411
- Mitsuya M, Mase T, Tsuchiya Y, Kawakami K, Hattori H, Kobayashi K, Ogino Y, Fujikawa T, Satoh A, Kimura T, Noguchi K, Ohtake N, Tomimoto K** (1999) J-104129, a novel muscarinic M3 receptor antagonist with high selectivity for M3 over M2 receptors. *Bioorg Med Chem* 7: 2555–2567
- Mohr F, Zimmermann M, Klein J** (2013) Mice heterozygous for AChE are more sensitive to AChE inhibitors but do not respond to BuChE inhibition. *Neuropharmacology* 67: 37–45
- Moncoq K, Trieber CA, Young HS** (2007) The molecular basis for cyclopiazonic acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *J Biol Chem* 282: 9748–9757
- Moser N, Mechawar N, Jones I, Gochberg-Sarver A, Orr-Urtreger A, Plomann M, Salas R, Molles B, Marubio L, Roth U, Maskos U, Winzer-Serhan U, Bourgeois J, Le Sourd A, Biasi M de, Schroder H, Lindstrom J, Maelicke A, Changeux J, Wevers A** (2007) Evaluating the suitability of nicotinic acetylcholine receptor antibodies for standard immunodetection procedures. *J Neurochem* 102: 479–492
- Nachmansohn D, Machado AL** (1943) The formation of acetylcholine. A new enzyme: "Choline acetylase". *J Neurophysiol* 6: 397–403
- Neves SR, Ram PT, Iyengar R** (2002) G protein pathways. *Science* 296: 1636–1639
- Nies AT, Hofmann U, Resch C, Schaeffeler E, Rius M, Schwab M** (2011) Proton pump inhibitors inhibit metformin uptake by organic cation transporters (OCTs). *PLoS ONE* 6: e22163
- Nobelprize.org**. Kary B. Mullis - Facts". Nobel Media AB 2014. Web. 14 Aug 2014. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-facts.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-facts.html)
- Okuda T, Haga T** (2000) Functional characterization of the human high-affinity choline transporter. *FEBS Lett* 484: 92–97
- Okuda T, Haga T, Kanai Y, Endou H, Ishihara T, Katsura I** (2000) Identification and characterization of the high-affinity choline transporter. *Nat Neurosci* 3: 120–125
- Onodera K, Pouokam E, Diener M** (2013) STIM1-regulated Ca<sup>2+</sup> influx across the apical and the basolateral membrane in colonic epithelium. *J Membr Biol* 246: 271–285

- Parker, JC, Sarkar, D, Quick, MW, Lester, RAJ** (2003) Interactions of atropine with heterologously expressed and native  $\alpha 3$  subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors. *Brit J Pharmacol* 138: 801-810
- Parsons, DS, Paterson, CR** (1965) Fluid and solute transport across rat colonic mucosa. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 50: 220–231
- Pfeil U, Lips KS, Eberling L, Grau V, Haberberger RV, Kummer W** (2003) Expression of the high-affinity choline transporter, CHT1, in the rat trachea. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 473–477
- Pfeil U, Vollerthun R, Kummer W, Lips KS** (2004) Expression of the cholinergic gene locus in the rat placenta. *Histochem. Cell Biol* 122: 121-130.
- Potten CS, Booth C, Pritchard DM** (1997) The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *Int J Exp Pathol* 78: 219–243
- Proskocil BJ** (2004) Acetylcholine Is an Autocrine or Paracrine Hormone Synthesized and Secreted by Airway Bronchial Epithelial Cells. *Endocrinology* 145: 2498–2506
- Rafferty MA, Hunkapiller MW, Strader CD, Hood LE** (1980) Acetylcholine receptor: complex of homologous subunits. *Science* 208(4451): 1454–1456
- Reinheimer T, Bernedo P, Klapproth H, Oelert H, Zeiske B, Racke K, Wessler I** (1996) Acetylcholine in isolated airways of rat, guinea pig, and human: species differences in role of airway mucosa. *Am J Physiol* 270: L722-8
- Rossier J** (1977) Acetyl-coenzyme A and coenzyme A analogues. Their effects on rat brain choline acetyltransferase. *Biochem J* 165: 321–326
- Sastry BV, Sadavongvivad C** (1978) Cholinergic systems in non-nervous tissues. *Pharmacol Rev* 30: 65–132
- Schäfer MK, Weihe E, Varoqui H, Eiden LE, Erickson JD** (1994) Distribution of the vesicular acetylcholine transporter (VACHT) in the central and peripheral nervous systems of the rat. *J Mol Neurosci* 5: 1–26
- Schemann M, Sann H, Schaaf C, Mader M** (1993) Identification of cholinergic neurons in enteric nervous system by antibodies against choline acetyltransferase. *Am J Physiol* 265: G1005-9
- Schirmer SU, Eckhardt I, Lau H, Klein J, DeGraaf YC, Lips KS, Pineau C, Gibbins IL, Kummer W, Meinhardt A, Haberberger RV** (2011) The cholinergic system in rat testis is of non-neuronal origin. *Reproduction* 142: 157–166
- Schuller HM** (2009) Is cancer triggered by altered signalling of nicotinic acetylcholine receptors? *Nat Rev Cancer* 9: 195–205

- Schultheiss G, Kocks SL, Diener M** (2002) Methods for the study of ionic currents and  $\text{Ca}^{2+}$ -signals in isolated colonic crypts. *Biol Proced Online* 3: 70–78
- Shi H, Wang H, Lu Y, Yang B, Wang Z** (1999) Choline modulates cardiac membrane repolarization by activating an M3 muscarinic receptor and its coupled  $\text{K}^+$  channel. *J Membr Biol* 169(1): 55–64
- Shi H, Wang H, Wang Z** (1998) Choline is a selective agonist of M3 subtype of muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in cardiac myocytes. *Can J Cardiol* 14: 144F
- Siefjediers A, Hardt M, Prinz G, Diener M** (2007) Characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor subtypes at rat colonic epithelium. *Cell Calcium* 41: 303–315.
- Sine JP, Ferrand R, Colas B** (1988) Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in the gut mucosal cells of various mammal species: distribution along the intestine and molecular forms. *Comp Biochem Physiol* 91: 597–602
- Sobotta J, Becher H** (1972) Verdauungsapparat. In: H Ferner, J Staubesand (Eds.), *Atlas der Anatomie des Menschen*, Bd. 2, 17. Aufl., Urban und Schwarzenberg, München, Berlin, Wien: 61-143
- Soergel KH** (1994) Colonic fermentation: metabolic and clinical implications. *Clin Invest* 72: 742-748
- Song P, Rekow SS, Singleton C, Sekhon HS, Dissen GA, Zhou M, Campling B, Lindstrom J, Spindel ER** (2013) Choline transporter-like protein 4 (CTL4) links to non-neuronal acetylcholine synthesis. *J Neurochem* 126: 451–461
- Song P, Sekhon HS, Jia Y, Keller JA, Blusztajn JK, Mark GP, Spindel ER** (2003) Acetylcholine is synthesized by and acts as an autocrine growth factor for small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 63: 214–221
- Specht W** (1977) Morpholgy of intestinal wall. In: F Lauterbach (Ed.), *Intestinal permeation*, Excerpta Medica, Amsterdam,Oxford: 4-40
- Starke K** (2001) Pharmakologie cholinерger Systeme. In: W Forth, D Henschler, W Rummel, U Förstermann, K Starke. (Eds.), *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 3. Aufl., Urban & Fischer, München, Jena: 147-174
- Strabel D, Diener M** (1995) Evidence against direct activation of chloride secretion by carbachol in the rat distal colon. *Eur J Pharmacol* 274: 181-191
- Summers AE, Whelan CJ, Parsons ME** (2003) Nicotinic acetylcholine receptor subunits and receptor activity in the epithelial cell line HT29. *Life Sci* 72: 2091–2094

- Tanious FA, Veal JM, Buczak H, Ratmeyer LS, Wilson WD** (1992) DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 31: 3103–3112
- Tansey EM** (2006) Henry Dale and the discovery of acetylcholine. *C R Biol* 329: 419–425
- Tapper EJ, Lewand DL** (1981) Actions of a nicotinic agonist, DMPP, on intestinal ion transport in vitro. *Life Sci* 28: 155–162
- Tobin G, Giglio D, Lundgren O** (2009) Muscarinic receptor subtypes in the alimentary tract. *J Physiol Pharmacol* 60: 3–21
- Traiffort E, O'Regan S, Ruat M** (2013) The choline transporter-like family SLC44: properties and roles in human diseases. *Mol Aspects Med* 34: 646–654
- Tsien RY, Poenie M** (1986) Fluorescence ratio imaging: a new window into intracellular ionic signaling. *TIBS* 11: 450–455
- Tsuji S, Larabi Y** (1983) A modification of thiocholine-ferricyanide method of Karnovsky and Roots for localization of acetylcholinesterase activity without interference by Koelle's copper thiocholine iodide precipitate. *Histochemistry* 78: 317–323
- Tucek S** (1982) The synthesis of acetylcholine in skeletal muscles of the rat. *J Physiol* 322: 53–69
- Ussing HH, Zerahn K** (1951) Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 23: 110–127
- Weihe E, Schäfer MK, Schutz B, Anlauf M, Depboylu C, Brett C, Chen L, Eiden LE** (1998) From the cholinergic gene locus to the cholinergic neuron. *J Physiol* 92: 385–388
- Weihe E, Tao-Cheng JH, Schäfer MK, Erickson JD, Eiden LE** (1996) Visualization of the vesicular acetylcholine transporter in cholinergic nerve terminals and its targeting to a specific population of small synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3547–3552
- Weitz A** (2012) Untersuchungen zur Charakterisierung der an der Regulation des ziliären Transports beteiligten nikotinischen Acetylcholinrezeptoren im Trachealepithel der Maus, Inauguraldissertation, 1. Aufl. DVG Service, Giessen
- Wessler I, Kirkpatrick CJ** (2008) Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *Br J Pharmacol* 154: 1558–1571

- Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racke K** (1998) Non-neuronal acetylcholine, a locally acting molecule, widely distributed in biological systems: expression and function in humans. *Pharmacol Ther* 77: 59–79
- Wessler I, Kirkpatrick CJ, Racké K** (1999) The cholinergic 'pitfall': acetylcholine, a universal cell molecule in biological systems, including humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 198–205
- Wessler I, Roth E, Deutsch C, Brockerhoff P, Bittinger F, Kirkpatrick CJ, Kilbinger H** (2001) Release of non-neuronal acetylcholine from the isolated human placenta is mediated by organic cation transporters. *Br J Pharmacol* 134: 951–956
- White HL, Wu JC** (1973) Choline and carnitine acetyltransferases of heart. *Biochemistry* 12: 841–846
- Witzemann V, Barg B, Nishikawa Y, Sakmann B, Numa S** (1987) Differential regulation of muscle acetylcholine receptor  $\gamma$ - and  $\epsilon$ -subunit mRNAs. *FEBS Lett* 223: 104–112.
- Wong, Helen Pui Shan, Le Yu, Lam, Emily Kai Yee, Tai, Emily Kin Ki, Wu, William Ka Kei, Cho CH** (2007) Nicotine promotes cell proliferation via  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor and catecholamine-synthesizing enzymes-mediated pathway in human colon adenocarcinoma HT-29 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 221: 261–267
- Wonnacott S** (1997) Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci* 20: 92–98
- Wonnacott S., Barik J** (2007) Nicotinic ACh receptors. *Tocris Rev* 28, 1–20.
- Wu D, Hersh LB** (1994) Choline Acetyltransferase: Celebrating Its Fiftieth Year. *J Neurochem.* 62: 1653–1663
- Yajima T** (1988) Luminal propionate-induced secretory response in the rat distal colon in vitro. *J Physiol* 403:559–575
- Yajima T, Inoue R, Matsumoto M, Yajima M** (2011a) Non-neuronal release of ACh plays a key role in secretory response to luminal propionate in rat colon. *J Physiol* 589: 953–962
- Yajima T, Inoue R, Yajima M, Tsuruta T, Karaki S, Hira T, Kuwahara A** (2011b) The G-protein on cholesterol-rich membrane microdomains mediates mucosal sensing of short-chain fatty acid and secretory response in rat colon *Acta Physiol* 203: 381–389
- Zeisel SH** (2000) Choline: An essential nutrient for humans. *Nutrition* 16: 669–671.

**Zhou X, Ren J, Brown E, Schneider D, Caraballo-Lopez Y, Galligan JJ** (2002) Pharmacological properties of nicotinic acetylcholine receptors expressed by guinea pig small intestinal myenteric neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 889–897

**Zinner N** (2007) Darifenacin: a muscarinic M3-selective receptor antagonist for the treatment of overactive bladder. *Expert Opin Pharmacother* 8: 511–523

## 8 Danksagung

Nun ist es also endlich geschafft! Ein herzliches Dankeschön an all die Menschen, die mich in den letzten Jahren so großartig unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt Prof. Dr. Martin Diener für die Überlassung dieses spannenden Themas und die herausragende Betreuung. Seine unschlagbare Geduld und seine ständige Bereitschaft Fragen und Probleme schnell zu lösen, haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke für die vielen konstruktiven Ideen, Vorschläge und Diskussionen sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen bei der Versuchsplanung und -durchführung. Vielen Dank auch für die Möglichkeit, zahlreiche Kongresse zu besuchen und dort meine Ergebnisse zu präsentieren.

Danke Martin, für die einfach rundum gute Betreuung während meiner Doktorarbeit und danke für die Begeisterung an der Wissenschaft, die du mir vermittelt hast.

Dem Land Hessen danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit im Rahmen des LOEWE-Projektes „Non-neuronale cholinerge Systeme“. Prof. Dr. Wolfgang Kummer aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der JLU Gießen möchte ich danken, für die Betreuung als Co-Supervisor im Rahmen des Gießener Graduiertenzentrum Lebenswissenschaften (GGL). Prof. Dr. Jochen Klein und Helene Lau des Pharmakologischen Instituts für Naturwissenschaftler der Goethe Universität Frankfurt sei gedankt für die Durchführung der HPLC-Messungen.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an „meine Mädels“ Brigitta Brück, Bärbel Schmidt, Eva-Maria Haas und Alice Stockinger, da sie immer zur Stelle waren, wenn ich mal wieder am Verzweifeln war und am liebsten das Laborequipment zum Fenster hinausgeworfen hätte. Danke Mädels, ohne eure gute Laune wäre es nur halb so schön gewesen! Ervice Pouokam, Ph. D., danke ich dafür, dass er stets ein offenes Ohr für Fragen hatte, für das gewissenhafte Korrekturlesen meiner Dissertation und natürlich auch für die musikalische Untermalung der Laborarbeit. Danke auch an Michael Haas für die gewissenhafte Versorgung der Versuchstiere (und Dörte) und dafür, dass er stets gute Laune hatte. Ebenso danke ich dem Team der Campuswerkstatt, Gerd Herber, Alexander Heinrich und Norbert Wagner. Jede noch so ausgefallene Sonderanfertigung wurde von diesem Team schnell realisiert.

Meiner Mit-Doktorandin, Zimmergenossin und „Proviant-Meisterin“ Anna danke ich für die schöne Zeit, sowohl am Institut als auch auf Tagungen. Ein riesengroßes Dankeschön geht an Sybille, die mir stundenlang und mit einer schier unendlichen Geduld am Layout gefeilt hat und nebenbei auch immer für die nötige Ablenkung sorgte. Besonders herzlich möchte ich mich bei Daniela Ott für die ständige Hilfsbereitschaft bei Problemen jeglicher Art bedanken. Sie hatte jederzeit ein offenes Ohr und immer die passenden Worte für jede Lebenslage. Danke auch an Björn für die schnelle Lösung jeglicher PC-Probleme. Ein Anruf genügte! Prof. Dr. Joachim Roth danke ich herzlich für seine stets hilfreichen Ratschläge und Lebensweisheiten. Ein riesengroßes Dankeschön geht an die liebe Frau Karger, für ihre stets gute Laune (auch sehr früh morgens). Jenny danke ich für die gute Zusammenarbeit und ihre Hilfsbereitschaft. Bei PD Dr. Christoph Rummel möchte ich mich für die motivierenden Worte während der finalen Phase meiner Arbeit danken.

Die letzten Jahre wären nur halb so schön gewesen, ohne die lustigen Veranstaltungen neben bzw. nach der ganzen Arbeit. In diesem Sinne danke ich den „Mitgliedern des Bierclubs“, Janne, Verena, Sybille, Carmen, Eric, Thomas L., Matthias und Pikachu, für die schönen und sehr lustigen Abende und das leckere Essen. Desweiteren danke ich der Frühstücksrunde für die gesellige Stunde am Freitagmorgen und für die Laugenbrötchen. Nicht zu vergessen sind auch die überaus lustigen Kongressabende: danke an alle die dabei waren!!! Bei meinen ehemaligen Mit-Doktorandinnen Julia, Lisa, Franzi und Sandy sei ebenfalls für die schöne Zeit gedankt. Meinem ehemaligen Mit-Doktoranden Thomas H. danke ich für „Dörte“! Natürlich möchte ich mich auch bei all den Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Physiologie und -Biochemie, die ich noch nicht namentlich genannt habe, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit bedanken. Ein großes Dankeschön geht an meine lieben Nachbarn Renate und Frieder Kreutz für die stets willkommene Ablenkung und das gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit. Danke an meine beiden Mädels Queeny und Phoebe, die mich treu durch Studium und Doktorarbeit begleitet haben. Zuletzt danke ich meinem Freund Matthias für seine Liebe und seinen unerschütterlichen Glauben an mich. Danke mein Schatz, dass du immer für mich da warst. Du bist mein Fels in der Brandung!



## 9 Eigene Publikationen

### Publiziert:

Pouokam E, Bader S, Brück B, Schmidt B, Diener M (2013)

ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in rat colonic epithelium.

*Pflügers Arch Eur J Physiol* 465: 865-877

Rehn M, Bader S, Bell A, Diener M (2013)

Distribution of voltage-dependent and intracellular Ca<sup>2+</sup> channels in submucosal neurons from rat distal colon.

*Cell Tissue Res* 353:355-366

Bader S, Klein J, Diener M (2014)

Choline acetyltransferase and organic cation transporters are responsible for synthesis and propionate-induced release of acetylcholine in colon epithelium.

*Eur J Pharmacol* 733: 23-33

### Eingereicht zur Publikation:

Bader S, Diener M (2014)

Epithelial nicotinic receptors involved in the induction of colonic anion secretion.

*Eur J Pharmacol*, submitted 23.07.2014, EJP-40323

### In Vorbereitung:

Schütz B, Bader S, Krasteva-Christ G, Ringer C, von Engelhardt J, Monyer H, Chubanov V, Gudermann T, Kummer W, Diener M, Weihe E (2014)

Chemical coding and chemosensory properties of cholinergic brush cells in the mouse gastrointestinal and biliary systems.

### Publizierte Abstracts:

Bader S, Diener M (2013)

Transporters, enzymes and receptors involved in the non-neuronal cholinergic system of rat colonic epithelium.

*J Physiol Biochem* 69: 675

Bader S., Klein J., Diener M. (2013)

The non-neuronal cholinergic system in rat colonic epithelium.

*J Physiol Biochem* 69: 663

Bader S, Klein J, Diener M (2013)

Expression and function of non-neuronal acetylcholine in rat colonic epithelium.

*Auton. Neurosci. Bas Clin* 177: 49-50

Schütz B, Bader S, Ringer C, Gäckler C, Krasteva-Christ G, Kummer W, Diener M, Weihe E (2013).

The cholinergic phenotype and responsiveness of brush cells in the mouse digestive tract. *Auton. Neurosci Bas Clin* 177: 63

### **Erklärung**

Ich erkläre: „Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Sandra Bader



édition scientifique  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN**

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6244-6



9 7 8 3 8 3 5 9 6 2 4 4 6